Untersuchungen zum Streckungswachstum der Pflanzen

Annelore Krauß

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0037

Untersuchungen zum Streckungswachstum der Pflanzen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
München

vorgelegt
von

Annelore Krauß
aus
München

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Hager

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 2. 1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Inhaltsverzeichnis

Seite

E I N L E I T U N G 1

TEIL I: VERSUCHE ZUR PRIMÄRWIRKUNG DES AUXINS: VERGLEICH ZWISCHEN SÄUREBEDINGTEM UND IES-BEDINGTEM STRECKUNGSWACHSTUM. WIRKUNG DER NUCLEOSIDTRIPHOSPHATE

Einleitung 3

Material und Methoden 6

1. Anzucht von Avena sativa 6

2. Messung des Streckungswachstums (SW) von Avena-Koleoptil-Segmenten in einer Durchflußkammer 6

2.1. Vorbehandlung der Koleoptilen 6

2.2. Mikroskop 6

2.3. Durchflußkammer 7

2.4. Versuchslösungen und Chemikalien 9

Ergebnisse 10

1. Kinetik des säurebedingten SW und Vergleich mit dem IES-bedingten SW 10

1.1. pH-Reihe in luftgesättigter und O_2-freier Lösung 11

1.2. "Abschalten" des säurebedingten SW durch hohen pH-Wert und "Wieder-Anschalten" durch niederen pH-Wert 15

1.3. "Abschalten" des IES-bedingten SW durch hohen pH-Wert und "Wieder-Anschalten" durch pH 5,0.. 19

1.4. Hemmung des IES-bedingten und säurebedingten SW durch Cu^{++}..... 19

1.5. Hemmung des IES-bedingten und säurebedingten SW durch CCCP 22

2. Hemmung des IES-bedingten SW durch O_2-Entzug und "Wieder-Anschalten" durch ATP 28

2.1. Wirkung von ATP auf das SW unter N_2 28

2.2. Wirkung von K^+, Mg^{++} und Ca^{++} auf das ATP-bedingte und IES-bedingte SW 31

2.2.1. Additive Wirkung von K^+ und Mg^{++} bei konstanter Na^+-Konzentration 31

2.2.2. Konzentrationsoptimum der Cofaktoren-Mischung $K^+ + Mg^{++}$ 31

Seite

2.2.3. Konzentrationsoptimum von ATP 31
2.2.4. Ersatz von Mg^{++} durch Ca^{++}..... 35
2.2.5. Konzentrationsoptima von K^{+}, Mg^{++} und Ca^{++} bei konstanter Na^{+} und konstanter ATP-Konzentration 35
2.2.6. Einfluß von K^{+}, Mg^{++} und Ca^{++} auf das IES-bedingte SW in Aerobiose 35
2.3. "Abschalten" des ATP-bedingten SW durch hohen pH-Wert und "Wieder-Anschalten" durch pH 5,5. 39
2.4. Hemmung des ATP-bedingten SW durch CCCP 40
3. "Wieder-Anschalten" des IES-bedingten SW in Anaerobiose durch CTP, GTP, ITP und UTP 40
4. Wirkung der IES-Zugabe unter Anaerobiose in Gegenwart von ATP, UTP, CTP, ITP, GTP 43
5. Verhalten von ATP und ITP beim SW in Luft 46
6. Die Wirkung von 3', 5'-AMP auf das SW 49
7. Der "stored growth"-Effekt nach Anaerobiose 49

TEIL II: BEZIEHUNGEN ZWISCHEN WUCHSSTOFFATMUNG UND AUXIN-BEDINGTEM STRECKUNGSWACHSTUM

Einleitung 57
Material und Methoden 59
1. Anzucht von Helianthus annuus 59
1.1. Dekapitation und Wuchsstoffverarmung 59
2. Wachstumsversuche 59
3. Atmungsmessung 60
Ergebnisse 62
1. Kinetik des endogenen und IES-bedingten SW bei intakten und verschieden lange "verarmten" Hypokotylen 62
1.1. Endogene Wachstumshemmung intakter Pflanzen und ihre möglichen Ursachen 64
1.2. Wirkung von Substratzugabe auf das SW stark verarmter Pflanzen 66
1.3. Vorbehandlung mit $CaCl_2$-Lösung und ihre Wirkung auf das SW stark verarmter Pflanzen 67
2. Kinetik der IES-bedingten Atmungssteigerung bei intakten und verschieden lange "verarmten" Hypokotylen 67

Seite

TEIL III: WACHSTUMS-HEMMSTOFFE AUS HELIANTHUS ANNUUS UND IHR WIRKUNGSMECHANISMUS

Einleitung 74

Material und Methoden 75

1. Anzucht von Helianthus annuus 75
2. Diffusate 75
3. Gewebe-Extrakte 75
4. Papierchromatographische Trennung der Aetherphase 76
5. Dünnschichtchromatographische Trennung der Aetherphase 76
6. Sprühreagentien 77
7. Biotest 77
8. Reindarstellung der Inhibitoren 77
9. UV-Absorptionsspektren von I_1, I_2 und I_3 78
10. Massenspektrogramm von I_3 78
11. NMR-Spektrum von I_3 78
12. Decarboxylierung von IES-1-^{14}C in vivo 78
    12.1. Reaktionslösung und Versuchspflanzen 79
    12.2. Messung des $^{14}CO_2$ 79
13. Kurzzeitmessung des SW von Avena-Koleoptilabschnitten nach Zugabe von I_3 79

Ergebnisse 80

1. Der Inhibitorgehalt von Diffusaten und Gewebeextrakten 80
    1.1. Diffusate 80
    1.2. Gewebeextrakte und ihr Inhibitorgehalt 81
2. Extrakte aus belichteten Primärblättern und chromatographische Trennung der Aetherphase 81
    2.1. Papierchromatographische Trennung der Aetherphase 83
    2.2. Dünnschichtchromatographische Trennung der I-Zone bzw. der gesamten Aetherphase 83

Seite

3. Reindarstellung und Eigenschaften der Inhibitoren I_1, I_2 und I_3 84
3.1. Reindarstellung 86
3.2. UV-Absorptionsspektren 86
3.3. Molekulargewicht von I_3 88
3.4. DS-chromatographischer Vergleich von I_1, I_2 und I_3 mit Portulac-Inhibitor, Heliangin und Xánthium-Inhibitor (nach den Daten von MITSUHASHI a. SHIBAOKA 1965) 88

4. Die Inhibitorbildung in vivo in Dauer-Blaulicht, Dauer-Rotlicht und Dauerdunkel 89
4.1. Der Habitus der Pflanzen bei der Ernte 89
4.2. Der Inhibitorgehalt der Extrakte 90

5. Die Wirkungsweise des Inhibitors I_3 in vivo 92
5.1. Decarboxylierung von IES-1-^{14}C in vivo mit und ohne I_3 93
5.2. Decarboxylierung von IES-1-^{14}C durch intakte und 1/2 Tag verarmte Hypokotyle 94
5.3. Kinetik der Wachstumshemmung der Avena-Koleoptile durch den Inhibitor I_3 95

D I S K U S S I O N 99

Z U S A M M E N F A S S U N G 115

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 121

Verzeichnis der im Text gebrauchten Abkürzungen

Chr.	Chromatogramm
DMCA	dimethylamino-cinnamonaldehyde = Dimethylamino-Zimtaldehyd
DS	Dünnschicht
Fm	einfacher mittlerer Fehler
I	Inhibitor
IES	Indol-3-Essigsäure
ipm	Impulse pro Minute
LM	Laufmittel
mMol	Millimol
µC	Mikrocurie
MG	Molekulargewicht
µm	Mikrometer
µMol	Mikromol
PCMB	para-Chloromercuribenzoat
PHMB	para-Hydroxomercuribenzoat
RNA	ribonucleic acid = Ribonucleinsäure
SH-	Sulfhydryl-
SW	Streckungswachstum
UV	Ultraviolett
ZW	Zellwand

Weitere Abkürzungen s. Material und Methoden bei Teil I, II und III.

E I N L E I T U N G

Das Streckungswachstum höherer Pflanzen, d.h. die irreversible Längenzunahme der Pflanzenzelle, wird durch Auxine hormonell gesteuert.
Dabei ändern sich bestimmte Stoffwechselgrößen, z.B. die Atmungsrate, und außerdem die mechanischen Eigenschaften der Zellwand, wodurch schließlich die Zellstreckung ermöglicht wird.

Bis jetzt ist es freilich nicht gelungen, zumindest eine Teilreaktion des auxinbedingten SW außerhalb der lebenden Zelle ablaufen zu lassen (wenn man von den Arbeiten SARKISSIAN's und seiner Mitarbeiter absieht, die nicht unwidersprochen blieben). Der Ort der Primärreaktion des Auxinmoleküls ist noch unbekannt. Um Hinweise auf diesen Ort in der Zelle zu erhalten, ist die Untersuchung des SW deshalb noch weitgehend auf Beobachtungen und Messungen am intakten, lebenden Gewebe angewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, von verschiedenen Seiten her Fakten über das Problem der Primärwirkung der Auxine zu sammeln.

Der erste Teil befaßt sich mit den Zusammenhängen zwischen dem sog. säurebedingten, dem auxinbedingten und dem durch Nucleosidtriphosphate beeinflußten Streckungswachstum. Die dabei gefundenen Ergebnisse führen zu einer Hypothese über die Wirkungsweise der Auxine.

Im zweiten Teil wurde die Frage, ob die sog. Wuchsstoffatmung sekundäre Folge oder Primärerscheinung beim SW ist, am wuchsstoffverarmten Hypokotyl von Helianthus annuus untersucht.

Dabei zeigte sich ein eigentümliches Phänomen, nämlich, daß ca. 12 - 24 h nach der Dekapitation die Helianthus-Hypokotyle im Segment-Schütteltest viel stärker auf Auxinlösung reagieren als frisch dekapitierte Hypokotyle. Die Ursachen dieser Erscheinung wurden im dritten Teil der Arbeit untersucht und ein u.a. dafür verantwortlicher Inhibitor des SW wurde charakterisiert.

TEIL I:

VERSUCHE ZUR PRIMÄRWIRKUNG DES AUXINS: VERGLEICH ZWISCHEN SÄUREBEDINGTEM UND IES-BEDINGTEM STRECKUNGSWACHSTUM. WIRKUNG DER NUCLEOSIDTRIPHOSPHATE

Einleitung

Daß Auxine vom IES-Typ die mechanischen Eigenschaften der Pflanzenzellwände verändern und dadurch die Zellstreckung ermöglichen, ist seit langem bekannt und bis heute immer wieder bestätigt worden (HEYN 1931 und 1940; BRAUNER a. HASMAN 1962; MENZEL 1966; CLELAND 1967a,1967b, 1968; MASUDA 1968, 1969; BURSTRÖM et al. 1970). Dies geschieht nur, wenn die Zelle lebt und atmet (CLELAND 1961, 1965, 1968). Doch den Ort der Primärreaktion der Auxine in der Zelle kennen wir noch nicht, obwohl viele Anstrengungen in dieser Richtung unternommen wurden.

In neuerer Zeit schien es eine Reihe von Beweisen zu geben, daß Auxine über eine Derepression bestimmter Gene wirken. Nach Auxin-Zugabe sollten via RNA- und Proteinsynthese zellwanderweichende Enzyme neu produziert werden (s. Fortschritte der Botanik: ZENK 1967b). Die Wachstumsförderung durch Auxine beginnt aber normalerweise etwa 10 min nach deren Zugabe (RAY a. RUESINK 1962, NISSL a. ZENK 1969). MASUDA und KAMISAKA (1969) fanden, daß auxininduzierte RNA-Synthese schon nach 10 min erfolgen kann.

Doch gegen die postulierte Derepressor-Wirkung der Auxine gibt es ernstzunehmende Beweise. CLELAND (1965) zeigte, daß Actinomycin D selbst bei über 90prozentiger Hemmung der RNA-

Synthese die IES-bedingte Erhöhung der Zellwanddehnbarkeit nicht beeinflußt. NELSON et al. (1969) stellten fest, daß Actinomycin D und 8-Azaguanin erst nach 45-60 min das auxinbedingte Wachstum hemmen; dagegen verursacht Cycloheximid sofortige Wachstumshemmung (s.auch CLELAND 1971). Die Autoren folgern daraus (wie bereits PENNY a. GALSTON 1966 und ARMSTRONG 1966), daß Auxin nicht auf dem Niveau der Transskription, sondern dem der Translation wirken müsse. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß Cycloheximid die Membranpermeabilität beeinflussen (REILLY et al. 1970), die Ionenaufnahme hemmen und die Atmung, wie 2,4-Dinitrophenol, steigern bzw. die oxidative Phosphorylierung entkoppeln kann (ELLIS a. MACDONALD 1970). Die Wachstumshemmung durch Cycloheximid muß deshalb nicht auf der Hemmung der Proteinsynthese beruhen.

Ein weiteres Argument gegen die auxinbedingte Neusynthese von Enzymen, welche die Zellstreckung bewirken sollen, bringen die Untersuchungen von NISSL und ZENK (1969). Die Autoren wiesen nach, daß die lag phase des auxinbedingten Streckungswachstums fast bis auf Null reduziert werden kann, wenn die IES-Konzentration und die Temperatur erhöht werden.
Dieser Befund spricht dafür, daß Auxin die Aktivität schon vorhandener Enzyme ändert. HERTEL et al. (1969) und RAYLE et al. (1970a) nehmen überdies an, daß die Orte, die den Transport von Auxinen vermitteln, zugleich die Wirkungsorte des Streckungswachstums sind.

Die vorliegende Arbeit knüpft zunächst an die Beobachtung an, daß gepufferte und ungepufferte Lösungen im pH-Bereich 4, unbeeinflußt von An- oder Abwesenheit von O_2, das Strekkungswachstum stark fördern (HAGER 1962), ebenso die Zellwanddehnbarkeit (MENZEL, Diss. 1966; HAGER et al. 1971).

Dies wird als Modell für die Endreaktion der Auxinwirkung in vivo angesehen. Demnach sollen die Auxine eine Reaktion in Gang bringen, die den pH in membrannahen Zellwand-Kompartimenten verändert (senkt) und damit u.U. die Aktivität von Enzymen beeinflußt, welche die Plastizität der Zellwand erhöhen.

Material und Methoden

1. Anzucht von Avena sativa

"Siegeshafer I" der Fa. Svalöv, Schweden, wurde 5 min in 1%iger Chinosollösung gebeizt, mit Wasser gründlich gespült und auf feuchtem Sägemehl im Dunkeln bei 20°C und 90% rel. Luftfeuchtigkeit angekeimt. Die Keimlinge erhielten am 3. Tag, ca. 24 h vor der Verwendung zum Versuch, 1 h Rotlicht.

2. Messung des Streckungswachstums (SW) von Avena-Koleoptil-Segmenten in einer Durchflußkammer

2.1. Vorbehandlung der Koleoptilen

Zum Versuch wurden 16-18 mm lange Koleoptilen ausgewählt. Die Spitze wurde in der Länge von 3 mm abgeschnitten und das darauffolgende Segment von 10 mm Länge verwendet. Die Primärblätter wurden entfernt. Alle Koleoptil-Segmente wurden nach der Vorinkubation bzw. unmittelbar vor Versuchsbeginn in H_2O dest. 2 min unter Vakuum infiltriert. Dadurch wurde während der Versuche ein schnellerer Gas- und Lösungswechsel erreicht; außerdem verminderte sich der Auftrieb der Koleoptile in der Wachstumskammer. Vor Beginn der Messungen wurden die Koleoptilen 15 min lang mit der Vorlauf-Lösung in der Durchflußkammer vorbehandelt, um eine Angleichung an die Versuchsbedingungen zu erreichen.

2.2. Mikroskop

Zur Beobachtung des Wachstums diente ein Horizontalmikroskop der Fa. Swift and Son, London. Es enthielt ein Zeiss-Objektiv mit 10facher Vergrößerung und ein Fadenkreuz-Okular mit 6facher Vergrößerung. Damit konnte bis zu einer Genauigkeit von 5 µm gemessen werden. Als Lichtquelle diente eine Mikro-

skoplampe mit vorgeschaltetem Grünfilter (kombiniert aus UVILEX-Glas der Fa. Schöninger, München, und zwei Schichten CELLON-Grünfilter der Fa. Gummi-Menzel, München).

2.3. Durchflußkammer

Das Wachstum wurde in einer senkrecht stehenden Plexiglas-Kammer (34 x 22 x 7 mm, außen) gemessen (s. Abb. 1 D). Am oberen Ende befanden sich ein Einlaufstutzen und ein Stutzen zur Entfernung der Luftblasen bei der Füllung der Apparatur, am unteren Ende war ein Auslaufstutzen angebracht. Der Deckel wurde mit einer Gummidichtung und sechs Versenkschrauben befestigt. Der senkrecht stehende Plexiglas-Dorn, auf den das Koleoptilsegment gesteckt wurde, war an der Innenseite des Deckels auf einem Plexiglas-Sockel befestigt.

Die Zu- und Ableitungen bestanden aus Silikonschlauch. Die Lösungen wurden durch zwei, in einem Wasserbad befindlichen, Glasrohrwendeln geleitet und so auf die gewünschte Temperatur gebracht (Abb. 1 B; Temperaturkontrolle nach Durchströmen der Plexiglaskammer). Die Durchströmungsgeschwindigkeit betrug 25 ml pro min; bei 30°C blieb die Temperatur von ca. 10 ml/min bis ca. 100 ml/min konstant. Die Geschwindigkeit wurde durch einen Quetschhahn am Ableitungsschlauch unterhalb der Durchflußkammer reguliert.

Der Lösungswechsel erfolgte durch Drehen eines Patenthahnes mit zwei schrägen Bohrungen unmittelbar vor der Durchflußkammer. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde nach dem Umschalten kurzzeitig erhöht, um den Lösungswechsel zu beschleunigen.
Durchflußkammer und Umschalthahn wurden auf eine Plexiglasplatte geschraubt (Abb. 1 C), die fest mit dem Horizontalmikroskop verbunden werden konnte.

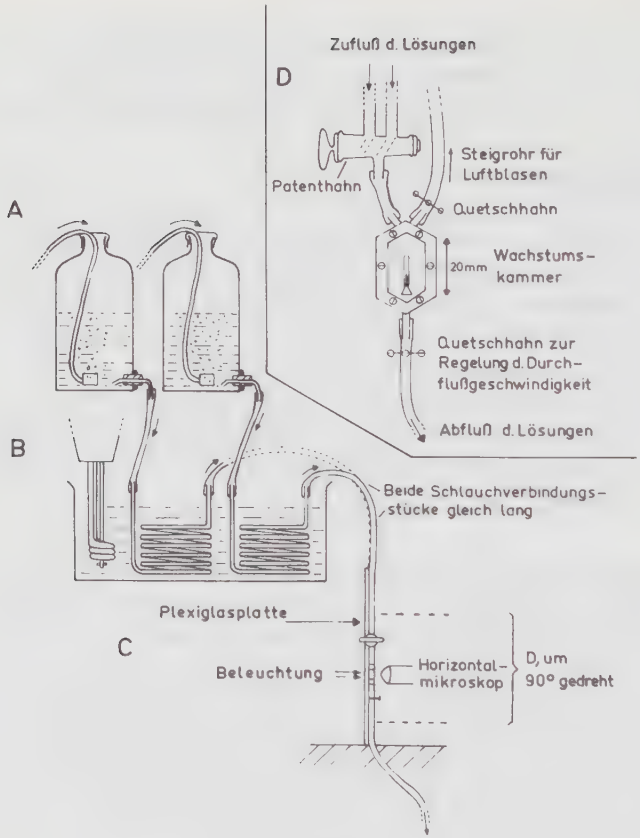


Abb. 1 Versuchsanordnung zur kontinuierlichen Messung des Streckungswachstums von Avena-Koleoptilabschnitten (Länge 10 mm) in einer Durchflußkammer (C,D) mit Hilfe eines Horizontalmikroskops.

A = Vorratsgefäße für Lösungen mit Einrichtungen für die Gaszufuhr

B = Wasserbad mit dünnwandigen Glaswendeln zur Temperaturangleichung der Lösungen

C = Wachstumskammer mit Beleuchtung und Horizontalmikroskop

D = Wachstumskammer, von vorn gesehen (Detail aus C).

Die Lösungen wurden in den etwas erhöht stehenden Vorratsgefäßen (Abb. 1 A) ab 30 min vor Versuchsbeginn und während des Versuches mit Luft bzw. N_2 durchperlt (mit Hilfe von Aquariums-Belüftungssteinen). Die Begasung von IES-Lösungen mit reinem O_2 verursachte Wachstumshemmung der Koleoptilen; der Grund hierfür könnte in der Bildung wachstumshemmender Oxidationsprodukte der IES gesucht werden.

2.4. Versuchslösungen und Chemikalien

Die Zusammensetzung der Lösungen ist im allgemeinen bei den einzelnen Versuchen angegeben.
Als Puffer für die pH-Wachstumsversuche wurde McIlvaine-Puffer (7,5 bzw. 5 mMol/l) von pH 3,5 bis 6,5 verwendet (hergestellt durch Mischung und Verdünnung von 0,1 m Stammlösungen von Citronensäure und $Na_2H\ PO_4$).
Der angegebene pH der Nucleosidphosphat-Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit NaOH bzw. HCl eingestellt, ebenso der pH der Vergleichslösungen.

Chemikalien: ATP (Adenosin-5'-triphosphat, di-Natriumsalz)
ADP (Adenosin-5'-diphosphat, tri-Natriumsalz)
AMP (Adenosin-5'-monophosphat, di-Natriumsalz)
3', 5'-AMP (cyclische 3', 5'-Monophosphorsäure)
CTP (Cytidin-5'-triphosphat, tri-Natriumsalz)
GTP (Guanosin-5'-triphosphat, tri-Natriumsalz)
ITP (Inosin-5'-triphosphat, tri-Natriumsalz)
IDP (Inosin-5'-diphosphat, tri-Natriumsalz)
IMP (Inosin-5'-monophosphat, di-Natriumsalz)
UTP (Uridin-5'-triphosphat, tri-Natriumsalz) von Boehringer, Mannheim;
CCCP (m-Chlorcarbonylcyanidphenylhydrazon) von Calbiochem, Los Angeles;
IES (Indol-3-essigsäure) von Merck, Darmstadt
2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) und
3,5-D (3,5-Dichlorphenoxyessigsäure) von Bayer, Leverkusen.

Ergebnisse

1. Kinetik des säurebedingten SW und Vergleich mit dem IES-bedingten SW

Es ist seit langem bekannt, daß die Zellstreckung auxinhaltiger Sprosse pH-abhängig ist (STRUGGER 1932, BONNER 1934, VAN SANTEN 1940, POHL 1948, NITSCH a. NITSCH 1956, SEGAL 1960). Allerdings schwanken die Angaben über den optimalen pH-Bereich, und dementsprechend sind die Deutungen dieser Erscheinungen verschieden. Im allgemeinen betrachtet man als Ursache für die Wachstumsförderung im pH-Bereich von 4-5 die Zurückdrängung der Dissoziation des Auxinmoleküls und damit seine bessere Aufnahme- bzw. Transportfähigkeit im Gewebe. In der Tat liegt nach ZENK und MÜLLER (1964) das pH-Optimum der IES-Aufnahme zwischen pH 4,5 und 4,8.

Die Förderung der Zellstreckung in sauren Lösungen ist jedoch auch bei wuchsstoffverarmten Helianthushypokotylen zu beobachten (HAGER 1962, HAGER et al. 1971), ja selbst in Abwesenheit von Sauerstoff, ohne den normalerweise auxinbedingtes Wachstum nicht stattfindet.

Saure Lösungen sind überdies imstande, die plastische Dehnbarkeit plasmolysierter Helianthus-Hypokotyle (MENZEL 1966, HAGER et al. 1971) oder eingefrorener und wieder aufgetauter Koleoptilen (RAYLE et al., 1970b) zu erhöhen. Diese Reaktion wird sehr stark durch Cu^{++} gehemmt (MENZEL 1966, HAGER et al. 1971).
Pektinase-Lösung steigert die plastische Dehnbarkeit der Helianthus-Hypokotyl-Zellwände am stärksten bei pH 4,0, zusätzlich zur Säurewirkung, und diese Reaktion wird ebenfalls durch Cu^{++} völlig gehemmt (MENZEL 1966).

Diese Beobachtung könnte als Indiz gelten, daß es sich bei der säurebedingten Plastizitätserhöhung der Zellwand um eine enzymkatalysierte Reaktion handelt und nicht allein um Hydrolyse glycosidischer oder anderer Bindungen.

Kurzzeitbeobachtungen des säurebedingten SW, vor allem unmittelbar nach seiner Auslösung, sind bisher noch nicht gemacht worden, mit Ausnahme der Untersuchungen von RAYLE und CLELAND (1970), die nur mit zwei pH-Stufen (3,0 und 3,8) und relativ alten Koleoptilen (25-32 mm lang) arbeiteten.

In den folgenden Versuchen wird das SW 10 mm langer Segmente von Avena-Koleoptilen in einer Durchflußkammer beobachtet (s. Material und Methoden). Ähnliche Methoden wurden bereits von RAY u. RUESINK (1962) und NISSL u. ZENK (1969) verwendet. Die hier gewählte Methode hat zwei wichtige Veränderungen gegenüber den zitierten Arbeiten:
Die Kammer ist vertikal angeordnet, so daß der Koleoptil-Zylinder, auf einem Dorn sitzend, ebenfalls vertikal steht und somit keinen geotropischen Einflüssen unterliegt.
Zum anderen kann mit Hilfe eines Horizontalmikroskops außer der Verlängerung der Koleoptile am oberen Ende auch die Position des unteren Koleoptil-Endes kontrolliert werden. Die Entfernung der beiden Meßstellen wird über einen Nonius vermessen.

1.1. pH-Reihe in luftgesättigter und O_2-freier Lösung

Die Abb. 2 zeigt die Kinetik des SW in Puffer verschiedener pH-Werte, von 3,5 bis 6,5, in luftgesättigter Lösung. Wird nach dem Vorlauf (H_2O dest.) Puffer von pH 3,5 bis 4,1 zugegeben, so steigert sich die Wachstumsgeschwindigkeit sofort, und zwar optimal bei pH 3,7-3,9, auf etwa das Siebenfache des Vorlaufwertes. pH 5,0 entspricht etwa dem

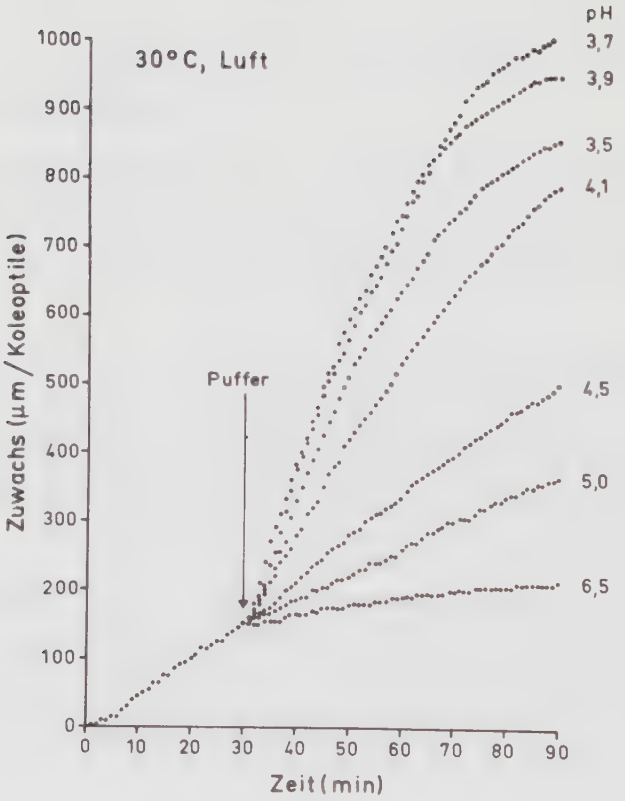


Abb. 2

Einfluß des pH-Wertes der Versuchslösung auf das SW von Avena-Koleoptil-Abschnitten (10 mm lang). Lösungen luftgesättigt, Vorlauf H_2O dest., dann McIlvaine-Puffer (7,5 mMol/l) von pH 3,5-6,5.

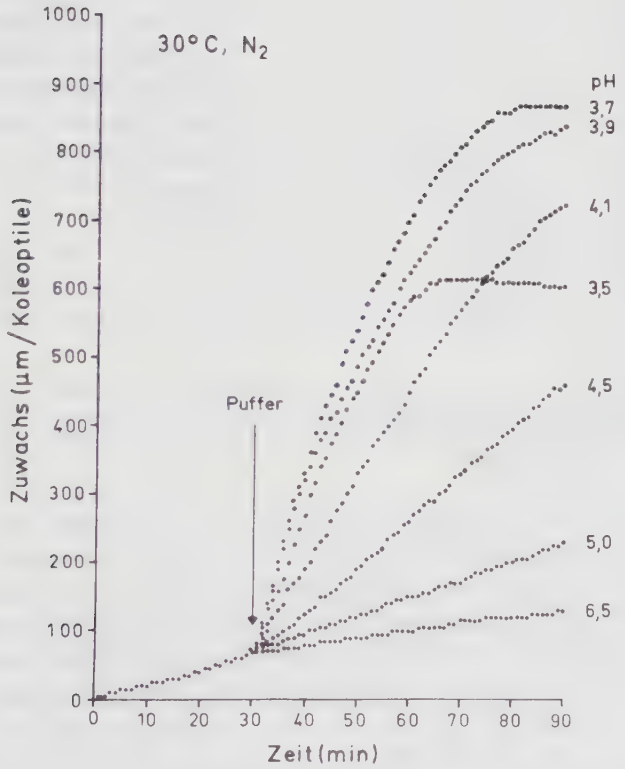


Abb. 3

Einfluß des pH-Wertes der Versuchslösung auf das SW von Avena-Koleoptil-Abschnitten (10 mm lang). Lösungen O_2-frei, N_2-gesättigt. Vorlauf und Puffer wie Abb. 2.
Das "säurebedingte" SW findet auch unter anaeroben Bedingungen statt.

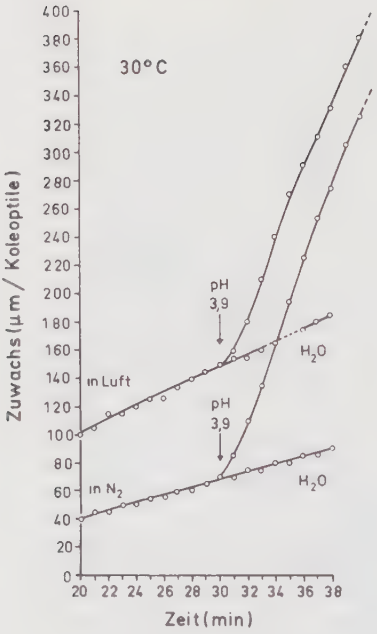


Abb. 4

Detail aus Abb. 2 und 3: Beginn des säurebedingten SW bei pH 3,9 unter aeroben und anaeroben Bedingungen: Die pH-abhängige Zellstreckung beginnt in beiden Fällen sofort, die Zuwachsraten sind praktisch gleich.

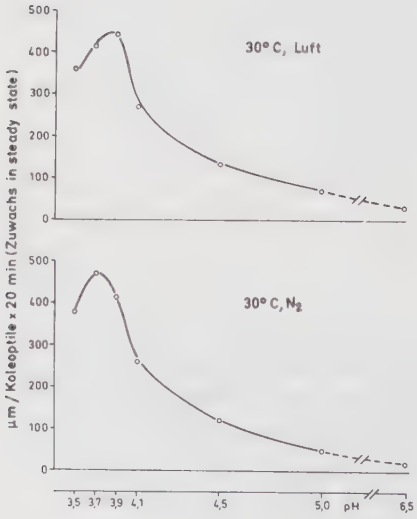


Abb. 5

pH-Optimum des säurebedingten SW in Luft- und N_2-gesättigter Lösung.
In beiden Fällen liegt es bei pH 3,8 - 3,9.

Vorlauf, pH 6,5 wirkt bereits leicht hemmend auf die Zellstreckung.

Fast dasselbe Bild zeigt sich unter anaeroben Bedingungen (Abb. 3 und 4); nur das "endogene" Wachstum während des H_2O-Vorlaufs ist stark gehemmt. Die pH-Stufen 3,5 und 3,7 schädigen die Koleoptilen bereits nach 30-40 min. (Dazu ist anzumerken, daß diese Schädigung nicht immer eintreten muß. Es kommen sehr widerstandsfähige Koleoptilen vor, die noch nach einer Stunde in pH 3,5 wachsen; im Normalfall haben die Segmente nach einer Stunde in pH 3,5 ihre Turgeszenz weitgehend eingebüßt. Wahrscheinlich wird bei diesem pH-Wert bereits die Zellmembran geschädigt; bei Anwesenheit von O_2 - Abb.2 - ist die Schädigung deutlich geringer.)

Das Optimum der Zellstreckung im steady state liegt demnach unter anaeroben und aeroben Bedingungen bei etwa pH 3,8 der Versuchslösung (Abb. 5).

Daß es beim säurebedingten SW nicht auf die Art des Puffers bzw. des Anions, sondern auf die H^+-Ionen-Konzentration ankommt, zeigt Abb. 6. HCl in entsprechender Verdünnung (pH 3,5) verursachte hier kurzzeitig die stärkste unter vergleichbaren Bedingungen beobachtete Zellstreckung (100 µm pro Koleoptil-Abschnitt pro min, d.h. 1% Verlängerung pro min!).

1.2. "Abschalten" des säurebedingten SW durch hohen pH-Wert und "Wieder-Anschalten" durch niederen pH-Wert

Abb. 7 zeigt, daß die Zellstreckung in saurer Lösung durch den Wechsel zu stark basischer Lösung sehr schnell "abgeschaltet" und durch erneuten Wechsel zu saurer Lösung ebenso schnell wieder "angeschaltet" werden kann. Diese Prozedur kann mit derselben Koleoptile mehrmals wiederholt werden. Zu den gewählten Lösungen ist folgendes zu bemerken: Puffer von pH 4,0 wurde als "Säurestufe" gewählt, weil er

bei genügend starker Zuwachsrate die Koleoptilen auch nach längerer Einwirkung noch nicht schädigt. Als "basische Stufe" erwies sich NaOH am geeignetsten. Ein Vorversuch zeigte, daß nach vierstündigem Schütteln in NaOH (1mMol/l, ca. pH 11,5) Koleoptil-Abschnitte im anschließenden Biotest mit IES-Lösung (10 µMol/l, pH 5,0; gepuffert mit McIlvaine-Puffer, 7,5 mMol/l) genau so stark wuchsen wie die 4 h in H_2O geschüttelten Kontrollen. NaOH schädigt selbst in massiven Konzentrationen (7,5 mMol/l, s.Abb. 9) die Koleoptilen kaum. Nimmt man statt NaOH einen basischen Puffer von pH 8 oder 9, so setzt die Hemmung der Zellstreckung langsamer ein und ist nicht so stark ausgeprägt.
Die gleiche "Treppenkurve" erhält man, wenn die Lösungen luftgesättigt sind (Abb. 8).

Nun stellt sich die entscheidende Frage:
Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem säurebedingten und dem auxinbedingten SW?
Wäre das der Fall, dann müßte man annehmen, daß das Auxin die Zellwandenzyme aktiviert, welche bei etwa pH 4 die Plastizität der Zellwand erhöhen. Ein direkter Einfluß von IES auf Zellwände mit intakten Enzymen kann aber nicht nachgewiesen werden (HAGER et al., 1971). Wie bereits festgestellt (s. Einleitung!), wirkt Auxin auf die Zellwandplastizität nur, wenn die Zellatmung nicht gehemmt ist.

Es könnte aber ein System geben, über welches das Auxin die H^+-Ionen-Konzentration außerhalb des Plasmalemmas zu erhöhen vermag, z.B. über die Beeinflussung einer "Protonenpumpe" oder Ionenpumpe, die nur bei intakter Zellatmung funktioniert.

Ionenpumpen werden in vielen Membranen angenommen; spezielle Protonenpumpen wurden von MITCHELL (1966, 1967) in Mitochondrien- und Chloroplasten-Membranen postuliert.

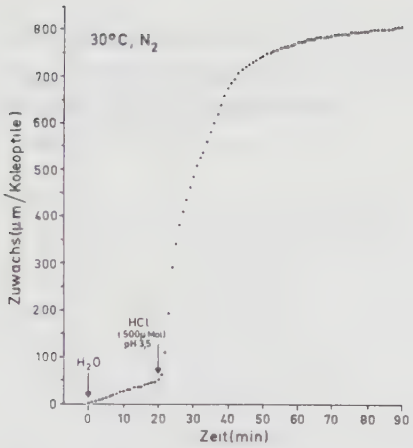


Abb. 6

Starke Zellstreckung mit verdünnter HCl (500 µMol/l; pH 3,5) unter N_2.
Das säurebedingte SW ist weitgehend unabhängig von der Art der Anionen und nur abhängig von der H^+-Ionen-Konzentration.

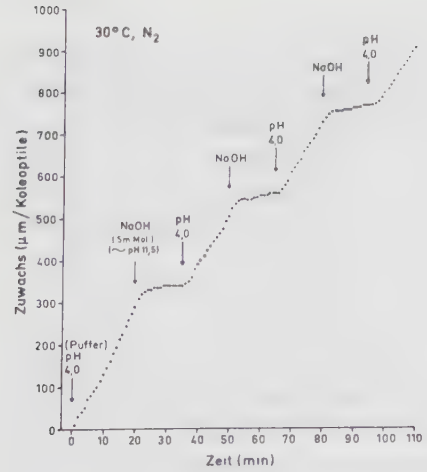


Abb. 7

An- und Abschalten des säurebedingten SW unter N_2 durch mehrmaligen Wechsel zwischen saurem Puffer (McIlvaine; 7,5 mMol/l; pH 4,0 und NaOH (5 mMol/l; pH ~11,5).

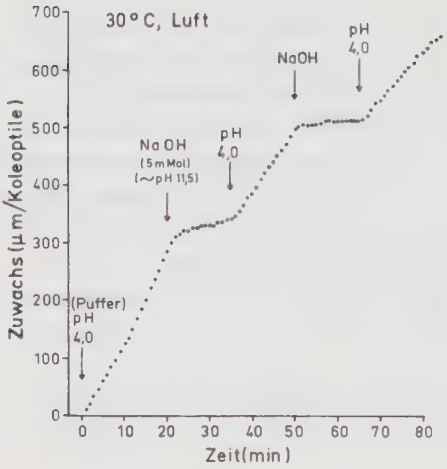


Abb. 8

An- und Abschalten des säurebedingten SW in luftgesättigter Lösung durch pH-Änderung (wie in Abb. 7).

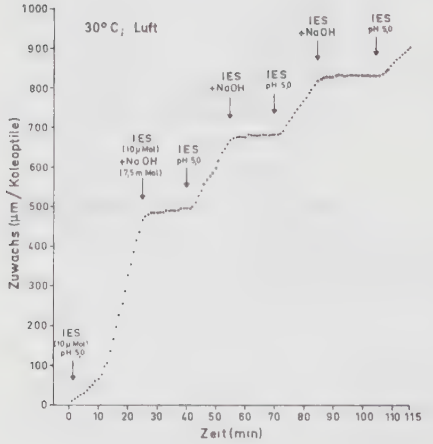


Abb. 9

An- und Abschalten des IES-bedingten SW durch mehrmaligen Wechsel zwischen IES-Lösung (pH 5,0; McIlvaine-Puffer; 7,5 mMol/l) und IES-Lösung + NaOH (7,5 mMol/l, pH ~12,0).

Wie auch immer dieses hypothetische, auxinmodulierte System beschaffen sein mag - wenn die Endwirkung des Auxins in einer Ansäuerung außerhalb des Plasmalemmas resultiert, müßte durch Abfangen der H^+-Ionen auch das auxinbedingte SW gehemmt werden.

1.3. "Abschalten" des IES-bedingten SW durch hohen pH-Wert und "Wieder-Anschalten" durch pH 5,0

In Abb. 9 wird gezeigt, daß die Zugabe von NaOH zu Koleoptilen das auxinbedingte SW sofort hemmt. Nach Entfernung der basischen Lösung setzt dieses innerhalb von 2 min wieder ein. Wie beim säurebedingten SW können saure und basische Lösung mehrmals wechseln; es ergibt sich dasselbe Bild. (Bemerkung zu den Versuchslösungen: Um eine möglichst starke Hemmung zu erzielen, wurde die NaOH-Konzentration auf 7,5 mMol/l erhöht. Bei niedrigeren Konzentrationen setzt die Hemmung etwas später ein und ist nicht komplett: NaOH scheint im free space bzw. in der Nähe des Plasmalemmas leicht abgepuffert zu werden, und zwar vor allem bei Anwesenheit von IES.)

Das auxinbedingte SW läßt sich demnach mit den gleichen Mitteln abschalten und dann wieder in Gang setzen wie das anaerobe und aerobe säureinduzierte SW.

1.4. Hemmung des IES-bedingten und säurebedingten SW durch Cu^{++}

Cu^{++} hemmt die Reaktion, die bei plasmolysierten Helianthus-Hypokotylen in saurer Lösung die plastische Dehnbarkeit der Zellwand steigert (MENZEL 1966, HAGER et al., 1971).
Wenn die Annahme stimmt, daß der letzte Schritt des Streckungswachstums (ob durch IES oder durch niederen pH-Wert ausgelöst) in der Erhöhung der Zellwandplastizität besteht, dann müßte Cu^{++} in beiden Fällen die Zellstreckung hemmen.

In einem Schütteltest (12 h bei 25°C, je 10 Avena-Koleoptil-Abschnitte von 10 mm Länge in 20 ml Lösung) wurde der Einfluß von $CuCl_2$ (Konzentrationsreihe von 0,01 µMol/l bis 1 mMol/l; pH 5,0) auf das IES-bedingte SW geprüft. Die IES-Konzentration betrug 10 µMol/l; die Lösungen waren gepuffert mit McIlvaine-Puffer (7,5 mMol/l). Das Ergebnis zeigt Tab. 1.

Tabelle 1 Einfluß von $CuCl_2$ auf das IES-bedingte SW (12h-Schütteltest bei 25°C)

	IES (10 µMol/l) pH 5,0	Puffer pH 5,0	IES + $CuCl_2$ (0,01 µMol)	IES + $CuCl_2$ (0,1 µMol)	IES + $CuCl_2$ (1 µMol)	IES + $CuCl_2$ (10 µMol)	IES + $CuCl_2$ (100 µMol)	IES + $CuCl_2$ (1 mMol)
Länge der Koleoptilen in mm	18,2 ±0,5	12,4 ±0,2	18,1 ±0,3	17,1 ±0,3	16,0 ±0,3	12,5 ±0,2	10,5 ±0,2	9,5 ±0,1

Daraus geht hervor, daß Cu^{++} nicht nur bis zu der geringen Konzentration von 0,1 µMol/l das IES-bedingte SW hemmt, sondern auch bei hohen Konzentrationen (1mMol/l) die Koleoptilen so zu schädigen vermag, daß sie während des 12h-Versuchs schrumpfen, d.h. daß der Turgormechanismus geschädigt wird.

Die Kurzzeitmessung dieser Cu^{++}-bedingten Wachstumshemmung (Abb.10, 11, 12) ergibt zum ersten, daß die Hemmung bei hohen Konzentrationen (5 mMol/l $CuCl_2$ und höher) schnell, d.h. innerhalb 2 bis 5 min eintritt, und daß sie beim IES- und säurebedingten SW irreversibel ist. Das wird besonders deutlich in Abb. 11 und 12, wo $CuCl_2$ nur als 1min-Puls gegeben wurde.
Diese kurze Anwendungszeit genügt, daß die Koleoptile irreversibel im Wachstum gehemmt wird (bei 5 mMol $CuCl_2$/l) bzw. buchstäblich "zusammenbricht" (bei 10 mMol $CuCl_2$/l; Abb.11).

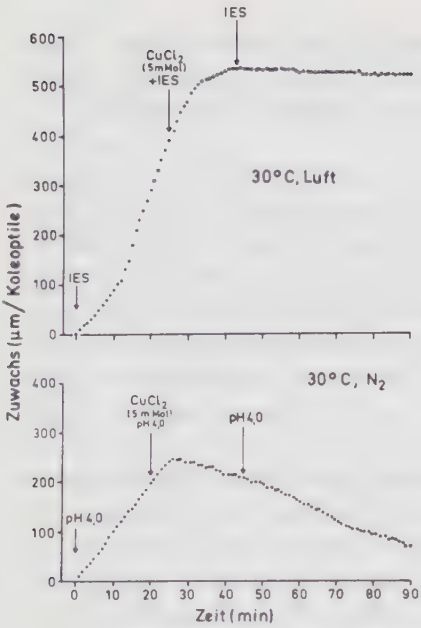
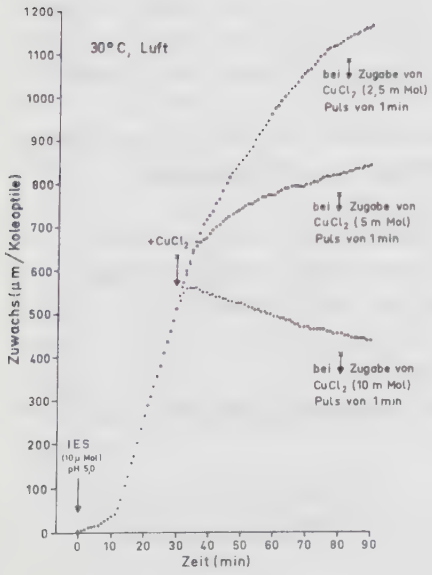
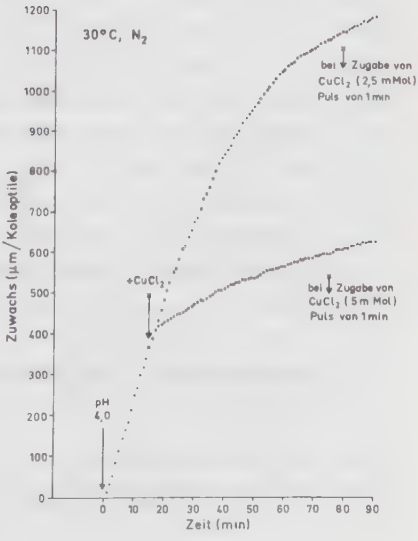


Abb. 10 (links)
Hemmung des IES-bedingten (oben) und säurebedingten (unten) SW durch Cu^{++} ($CuCl_2$, 5 mMol/l).
(IES 10 µMol/l, in McIlvaine-Puffer pH 5,0; bzw. McIlvaine-Puffer pH 4,0).

Abb. 11 (unten links) und Abb. 12 (unten rechts)
Hemmung des IES-bedingten (Abb.11) und säurebedingten (Abb.12) SW durch einen 1min-Puls hoher $CuCl_2$-Konzentrationen (2,5-10 mMol/l).
Lösungen wie in Abb. 10.
Die Hemmung des Wachstums durch Cu^{++} ist irreversibel; bei 10 mMol/l wird der Turgor geschädigt: die Koleoptile schrumpft.





Die Wachstumshemmung durch Cu^{++} kann diesen Ergebnissen zufolge nicht allein auf der Vergiftung von Zellwandenzymen beruhen, obwohl auch diese eine gewisse Rolle spielen wird.
Cu^{++} reagiert, wie andere Schwermetallionen, mit SH-Gruppen von Proteinen (GURD a. WILCOX, 1956; PASSOW et al., 1961). Wahrscheinlich sind diese funktionellen Gruppen (mit-)verantwortlich für die Erhaltung des Turgors, d.h. für die Funktion der Membranen (Plasmalemma und Tonoplast), da diese Funktion durch Cu^{++} so drastisch zerstört werden kann.(Die "geschrumpften" Koleoptilen sind nach dem Versuch nicht mehr voll turgeszent.)

Mit dem "klassischen" SH-Gruppen-Gift p-Chloromercuribenzoat bzw. p-Hydroxomercuribenzoat wurden entsprechende Versuche gemacht. Diese Substanzen sind allerdings bei pH 5,0 bzw. 4,0 schwer löslich und fallen bei höheren Konzentrationen als 10 µMol/l im Laufe des Versuchs aus der Lösung aus. Bei dieser Konzentration hemmt PCMB das IES-bedingte SW selbst bei 1stündiger Einwirkung nicht, das säurebedingte SW erst nach 20 min; dieses wird auf ca. 20% der Zuwachsrate reduziert.
PHMB ist etwas wirksamer: Es hemmt das IES-bedingte SW nach 15 min Einwirkung; die Zuwachsrate fällt auf ca. 70% der Kontrolle. Das säurebedingte SW wird nach 15 min Einwirkung von PHMB (10 µMol/l) komplett gehemmt, die Koleoptilen schrumpfen aber nicht.
Die dramatische Wirkung von Cu^{++} wird durch PCMB und PHMB nicht erreicht. Die beiden Substanzen dringen offenbar nur langsam und in geringer Konzentration ins Gewebe bzw. in die Zelle ein.

1.5. Hemmung des IES-bedingten und säurebedingten SW durch CCCP

Wenn wir annehmen, daß Auxin die Protonenkonzentration in einem Zellwandkompartiment außerhalb des Plasmalemmas er-

höht, dann sollten Substanzen, welche Membranen für Protonen durchlässig machen, diese Akkumulation verhindern. Die nach außen gepumpten Protonen würden dann sofort zurückfließen.
Eine der wirkungsvollsten Substanzen für diesen Zweck ist CCCP (HOPFER et al., 1968; HAROLD a. BAARDA 1968, HAGER 1969). Diese Substanz ist aber auch ein Entkoppler (s. BAUR a. WORKMAN 1964, MANTAI 1969), d.h. die Produktion von ATP wird in seiner Anwesenheit geringer. Auch das würde nach unserer Vorstellung zur Wachstumshemmung führen. Messungen der Atmung von Koleoptilen mit der Sauerstoffelektrode (oxygraphische Methode) zeigen jedoch, daß CCCP in den Konzentrationen 10 und 100 µMol/l in der Anwendungszeit von 20-30 min die Geschwindigkeit des O_2-Verbrauchs nicht verändert.

Nach unserer Modellvorstellung vom Streckungswachstum müßte die Kinetik der CCCP-Hemmung beim IES-bedingten SW anders verlaufen als beim säurebedingten.
Bei ersterem sollte die Hemmung sofort eintreten, weil die "äußere" Protonenkonzentration nicht aufrechterhalten wird. Beim säurebedingten SW sollte die Wachstumsgeschwindigkeit solange nicht beeinflußt werden, als der Turgor des Protoplasten noch erhalten bleibt.

In Abb. 13 und 14 ist die Kinetik der CCCP-Hemmung der beiden Zellstreckungs-Typen verglichen. Bei IES (pH 6,5) beginnt die Hemmung 1-2 min nach CCCP-Zugabe, bei Puffer vom pH 4,0 erst nach 10 min, führt dann aber sehr schnell zum "Zusammenbruch" der Koleoptile, der auch durch Wechsel zu CCCP-freier Lösung nicht aufgehalten werden kann.
Beim IES-bedingten SW kann die CCCP-Hemmung dagegen wieder aufgehoben werden, wenn zu CCCP-freier Lösung gewechselt wird. Die Ergebnisse entsprechen unseren Modellvorstellungen (s.o.).

Die starke Schädigung der Koleoptilen durch CCCP bei pH 4,0 könnte teilweise durch Anaerobiose verursacht sein. Um besser vergleichbare Verhältnisse zu schaffen, werden in der folgenden Versuchsreihe die Bedingungen verändert:
Das säurebedingte SW und seine Hemmung durch CCCP wird ebenfalls in luftgesättigter Lösung gemessen. Der pH der IES-Lösung wird auf 5,0 gesenkt, um ihn pH 4,0 möglichst anzunähern, aber doch "Säurewachstum" noch auszuschließen. Die Einwirkungsdauer von CCCP wird von 30 auf 20 min herabgesetzt. Die CCCP-Konzentration variiert von 0,01 µMol/l (nicht hemmend) bis 500 µMol/l (total hemmend bzw. letal).

In Abb. 15 und 16 ist das Ergebnis dargestellt:
Die Hemmung des IES-bedingten SW beginnt bei allen CCCP-Konzentrationen fast gleichzeitig (1-2 min nach Zugabe); beim säurebedingten SW setzt die Hemmung später ein und umso später, je niedriger die CCCP-Konzentration ist.
Die gerade nicht mehr hemmende Konzentration liegt beim IES-bedingten SW um 2 Zehnerpotenzen niedriger (0,01 µMol gegenüber 1 µMol beim säurebedingten SW).
Auch beim säurebedingten SW ist die CCCP-Hemmung bei niederen Konzentrationen reversibel, wenn die Koleoptile atmen kann (die beschädigten Membranen können "repariert" werden).
Selbst bei der höchsten (letalen) Konzentration (500 µMol/l) wird das säurebedingte SW deutlich später gehemmt als das IES-bedingte SW.

Die Unterschiede in Empfindlichkeit und Zeitdauer bis zum Beginn der CCCP-Hemmung bei beiden Wachstumstypen können wir uns nach unserer Modellvorstellung etwa so erklären:
Der Ort in der Zelle, an dem das IES-bedingte SW durch CCCP beeinflußt wird, ist leicht erreichbar; er liegt peripher (hypothetische Protonenpumpen des Plasmalemmas). Das IES-bedingte SW ist deshalb empfindlicher gegen CCCP, die Hemmung beginnt sofort. Das könnte freilich seinen Grund in der Entkoppler-Wirkung von CCCP haben, wodurch

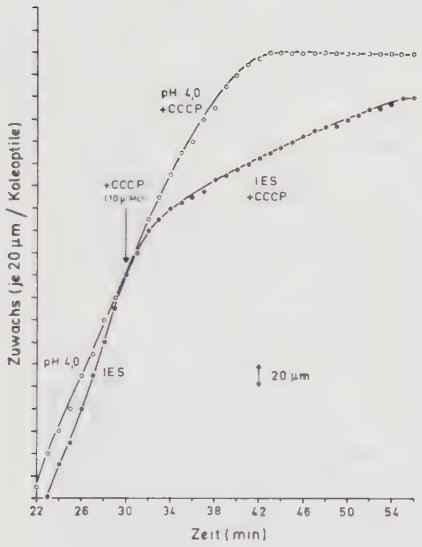


Abb. 13

Hemmung des IES-bedingten und säurebedingten SW durch CCCP (10 µMol/l)
(IES 10 µMol/l, in McIlvaine-Puffer, 7,5 mMol/l, pH 6,5; bzw. McIlvaine-Puffer, 7,5 mMol/l, pH 4,0).

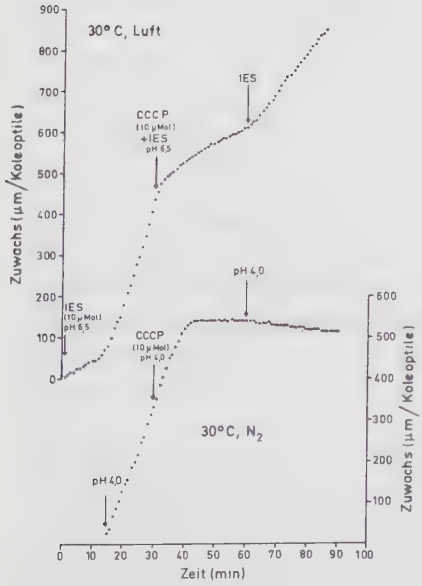


Abb. 14

Detail aus Abb. 13:
Das IES-bedingte SW wird durch CCCP innerhalb von 2 min gehemmt, das säurebedingte SW erst nach 10 min.

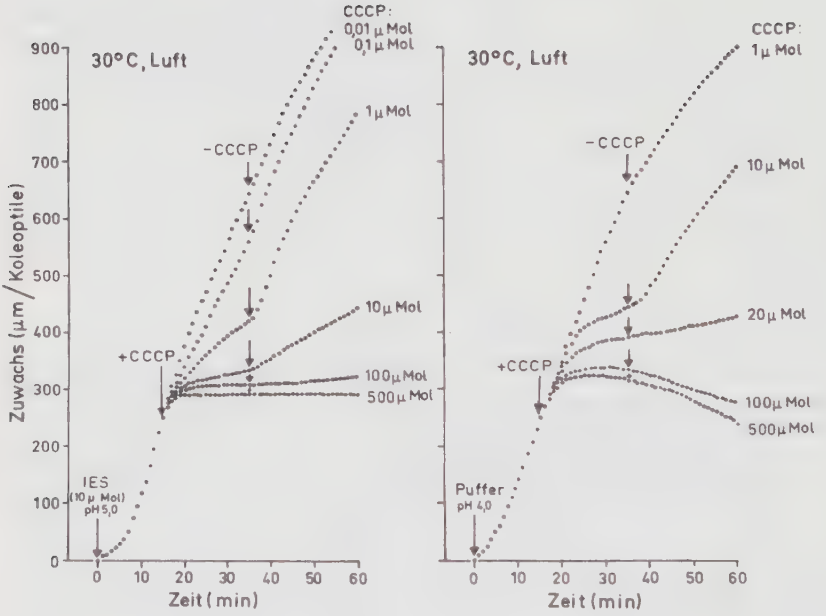


Abb. 15

Hemmung des IES-bedingten (links) und säurebedingten (rechts) SW durch verschiedene Konzentrationen von CCCP (von 0,01 µMol bis 500 µMol/l). Beide Versuchsreihen wurden in luftgesättigter Lösung durchgeführt. Die Hemmung setzt beim säurebedingten SW bei allen Konzentrationen später ein als beim IES-bedingten SW.

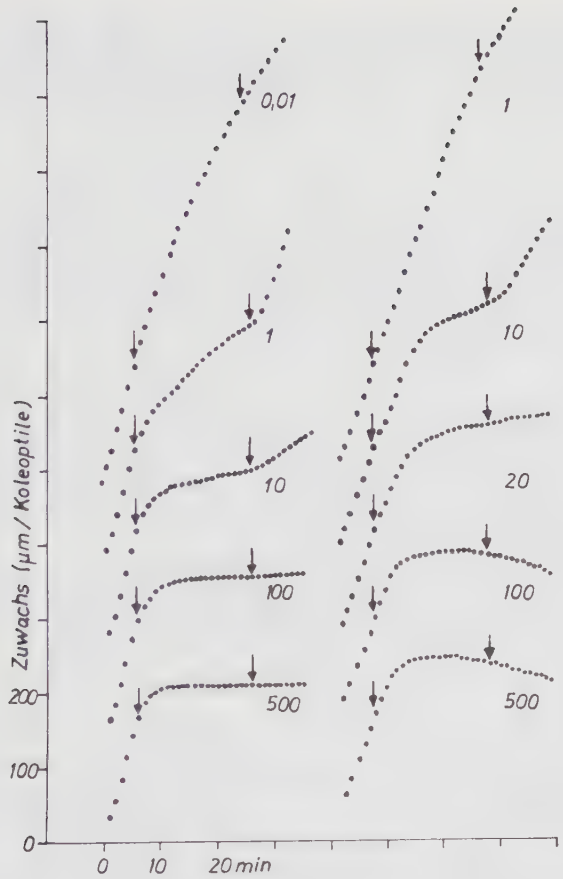


Abb. 16

Details aus Abb. 15: Hemmung des IES-bedingten (linke Seite) und säurebedingten (rechte Seite) SW durch CCCP. Die Zahlen geben die CCCP-Konzentration in µMol/l an. Beim 1. Pfeil jeder Kurve wurde CCCP zugegeben, beim 2. Pfeil zu CCCP-freier Lösung gewechselt.
Die Kurven etwa gleicher Hemmung wurden einander gegenübergestellt. Die gerade nicht mehr hemmende CCCP-Konzentration beträgt beim IES-bedingten SW 0,01 µMol/l (oberste Kurve links), beim säurebedingten SW 1 µMol/l

die Versorgung der Ionenpumpen mit dem Substrat ATP stark eingeschränkt würde. Doch in 2.4. und Abb. 29 wird gezeigt, daß CCCP das SW auch in Anwesenheit von ATP sofort und reversibel hemmt.
Der Ort der Hemmung des säurebedingten SW liegt "weiter innen"; es muß ein "Schwellenwert" (Konzentration x Zeit) überschritten werden, bis der Turgor der Zelle, etwa durch die bis zum Tonoplast einströmenden Protonen, in Mitleidenschaft gezogen wird. Die (hypothetischen) Zellwand-Enzyme werden durch CCCP nicht direkt beeinflußt.

Wenn unser Modell von den energieabhängigen Protonenpumpen in der Zellmembran stimmt, dann müßte eine, wenn auch bescheidene, Zellstreckung zu beobachten sein, wenn die zelleigene ATP-Produktion gehemmt wird (etwa durch anaerobe Bedingungen) und ATP von außen zugegeben wird.
ATP dringt allerdings sehr schlecht in Pflanzenzellen ein, da die verschiedensten ATPasen am Plasmalemma wirksam sind. Ein gewisser Prozentsatz könnte jedoch an die "Protonenpumpen" gelangen und sie wieder in Gang setzen.

2. Hemmung des IES-bedingten SW durch O_2-Entzug und "Wieder-Anschalten" durch ATP

Das IES-bedingte Streckungswachstum wird sehr schnell gehemmt, wenn der wachsenden Koleoptile kein Sauerstoff mehr zur Verfügung steht (Abb. 17). Wird er wieder zugegeben, setzt auch das Wachstum wieder ein (allerdings mit einem sehr merkwürdigen Verlauf der Kinetik; dieses Problem wird in 7. näher untersucht)

2.1. Wirkung von ATP auf das SW unter N_2

Vorbemerkung zu den Lösungen:
Die Lösungen der Nucleosid-tri-, di- und monophosphate wurden

im allgemeinen mit NaOH bzw. HCl auf den angegebenen pH eingestellt. Mit gepufferten Lösungen erreicht man die gleichen Wachstumsresultate wie mit den eingestellten; wegen der Untersuchung der Wirkungsweise zweiwertiger Kationen wie Ca^{++} bzw. Mg^{++} konnten Puffer nicht immer angewandt werden (s.u.).
Im pH-Bereich von 5,5, in dem die Zuwachsraten der Koleoptilen gegenüber denen in H_2O nicht verändert sind, gibt es kein (physiologisch unschädliches) Puffersystem, das nicht schwerlösliche Verbindungen mit den Erdalkali-Ionen bildet. Deshalb wurden die eingestellten Lösungen bevorzugt. Der pH-Wert der Lösungen veränderte sich während der Versuche nicht, da die Koleoptilen sich in einem Strom ständig erneuerter Lösung befanden.
Die Lösungen wurden mit nachgereinigtem Stickstoff durchgeblasen. Nach der Passage durch die gesamte Meßapparatur betrug der O_2-Gehalt weniger als 4 mm Hg (Partialdruck); in luftgesättigten Lösungen beträgt der O_2-Partialdruck bei 30°C ca. 80 mm Hg (gemessen mit der Sauerstoffelektrode).

Unter N_2 wird durch ATP (2 mMol/l, pH 5,5) das SW leicht beschleunigt (Abb. 18 oben). Gibt man die als ATPasencofaktoren bekannten Ionen K^+ und Mg^{++} dazu, wird das Ergebnis deutlich besser.
Werden die Koleoptilen vor der Anaerobiose 20 min lang bei 25°C in luftgesättigter IES-Lösung (10 µMol, Puffer pH 5,5) inkubiert, dann ist die Zuwachsrate mit ATP 2 bis 3 mal so groß wie ohne IES-Vorinkubation; sie kann durch K^+ und Mg^{++} weiter gesteigert werden (Abb. 18 unten).
Abb. 19 vergleicht die Kinetik des SW bei IES-vorbehandelten und nicht vorbehandelten Koleoptilen. Die Lösungen enthalten neben Na^+ die Cofaktoren K^+ und Mg^{++} (je 1 mMol/l). Das ATP-bedingte SW beginnt sofort und erreicht bei den IES-vorbehandelten Koleoptilen eine Rate, welche mit derjenigen des aeroben IES-bedingten SW durchaus vergleichbar ist. ADP und AMP haben geringe bzw. keine Wirkung (Abb. 19 unten).

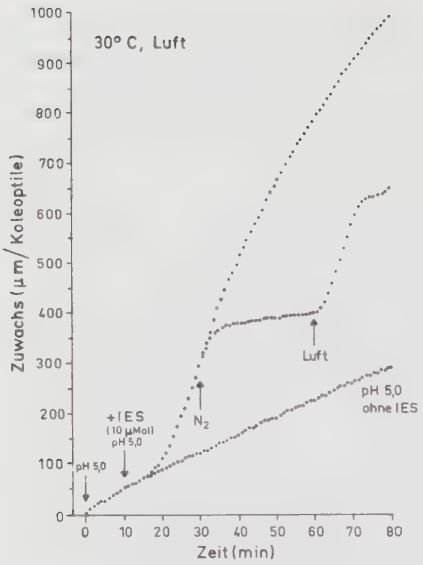


Abb. 17

Hemmung des IES-bedingten SW durch Anaerobiose. (IES 10 µMol/l, in McIlvaine-Puffer 5 mMol/l, pH 5,0)

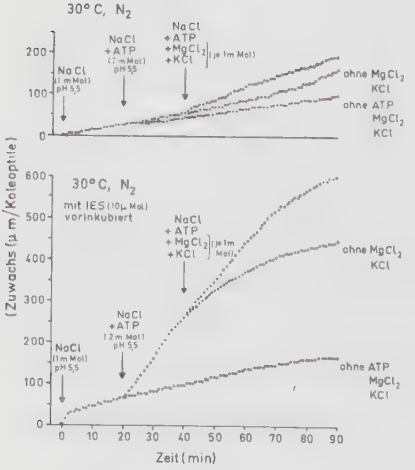


Abb. 18

Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose durch ATP (2 mMol/l, eingestellt auf pH 5,5); Verstärkung der ATP-Wirkung durch K^+ und Mg^{++} (je 1 mMol/l)

Obere Kurven: Koleoptilen nicht mit IES vorinkubiert.
Untere Kurven: Koleoptilen 20 min mit IES (10 µMol/l, in Puffer pH 5,0) in Aerobiose vorinkubiert.

2.2. Wirkung von K^+, Mg^{++} und Ca^{++} auf das ATP-bedingte und IES-bedingte SW

Die Cofaktoren K^+ und Mg^{++} beeinflussen die ATP-Wachstumsreaktion augenscheinlich stark. Ihre quantitative Wirkung soll nun näher untersucht werden.

2.2.1. Additive Wirkung von K^+ und Mg^{++} bei konstanter Na^+-Konzentration

Aus Abb. 20 können wir schließen, daß die wachstumsfördernde Wirkung von K^+ und Mg^{++} bei den gewählten Konzentrationen (je 1 mMol/l; die Na^+-Konzentration beträgt bei Anwesenheit von ATP ca. 6 mMol/l) additiv ist. Die Formen der Wachstumskurven sind charakteristisch verschieden für die beiden Ionen. Mit K^+ allein nähert sich die anfangs hohe Geschwindigkeit des ATP-Wachstums sehr bald der Sättigung; nach 20 min ist sie der Kontrolle angeglichen. Zugabe von Mg^{++} zu diesem Zeitpunkt führt zu neuerlicher Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit; die Rate fällt nicht mehr bis zu derjenigen der Kontrolle ab.
Mg^{++} allein bewirkt eine geringe, aber stetige ATP-Zuwachsrate, so daß der Gesamt-Zuwachs mit Mg^{++} allein nach 1h größer ist als mit K^+ allein. Durch Zugabe von K^+ kann die Mg^{++}-Wachstumsrate deutlich gesteigert werden.

2.2.2. Konzentrationsoptimum der Cofaktoren-Mischung K^+ + Mg^{++}

Bei konstanter Na^+- und ATP-Konzentration (ca 6 mMol bzw. 2 mMol/l) liegt das Optimum der Wachstumsförderung durch K^+ + Mg^{++} (1:1) im Bereich von je 10 µMol/l (Abb. 21 unten).

2.2.3. Konzentrationsoptimum von ATP (Abb. 22)

Bei konstanter K^+ + Mg^{++}-Konzentration (je 10 µMol/l) ist die Geschwindigkeit des SW optimal bei 2-3 mMol ATP/l.
(Der Na^+-Gehalt der Lösung wurde von 2 mMol ATP an abwärts

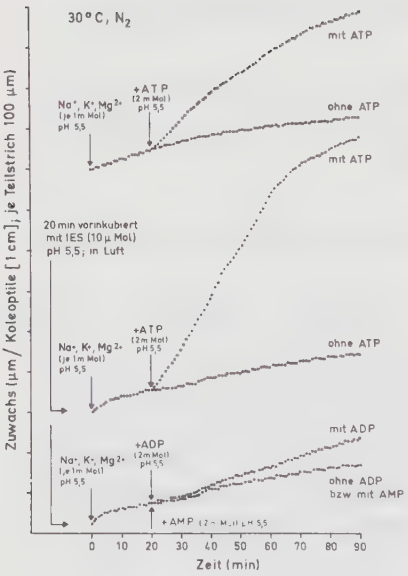


Abb. 19

Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose durch ATP (2 mMol/l) + Cofaktoren K^+ und Mg^{++} (je 1 mMol/l).

Obere Kurven: nicht mit IES vorinkubiert.

Mittlere und untere Kurven: mit IES vorinkubiert.

Untere Kurven: Wirkung von ADP und AMP unter gleichen Bedingungen.

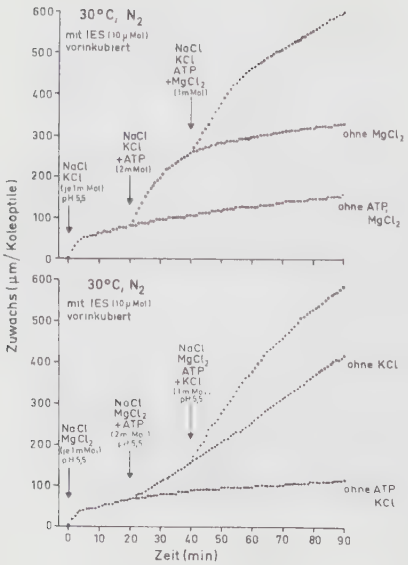


Abb. 20

Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose durch ATP (2 mMol/l); additive Wirkung der Cofaktoren K^+ und Mg^{++} (je 1 mMol/l)

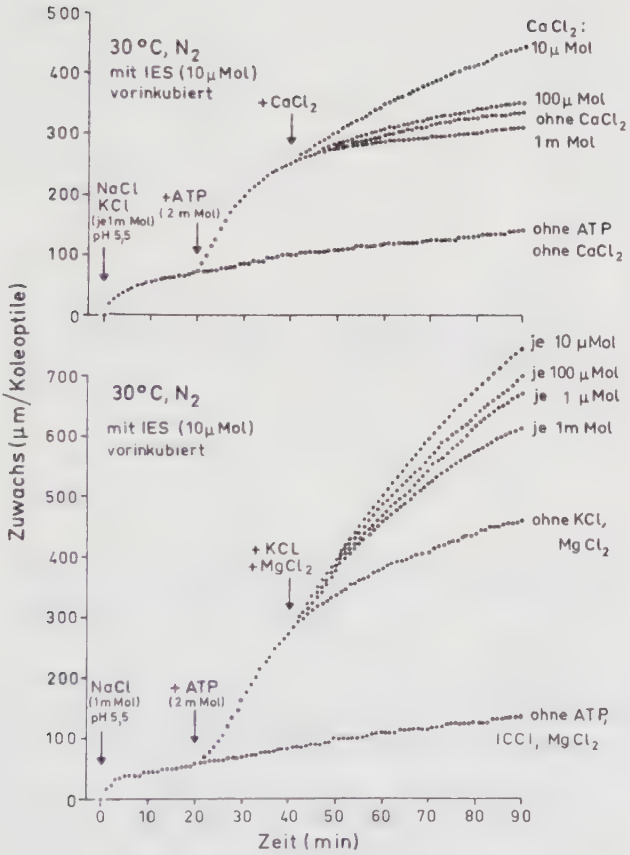


Abb. 21

Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose durch ATP.
Oben: additive Wirkung von K^+ und Ca^{++}.
Unten: Konzentrationsoptimum der Cofaktoren K^+ + Mg^{++}.

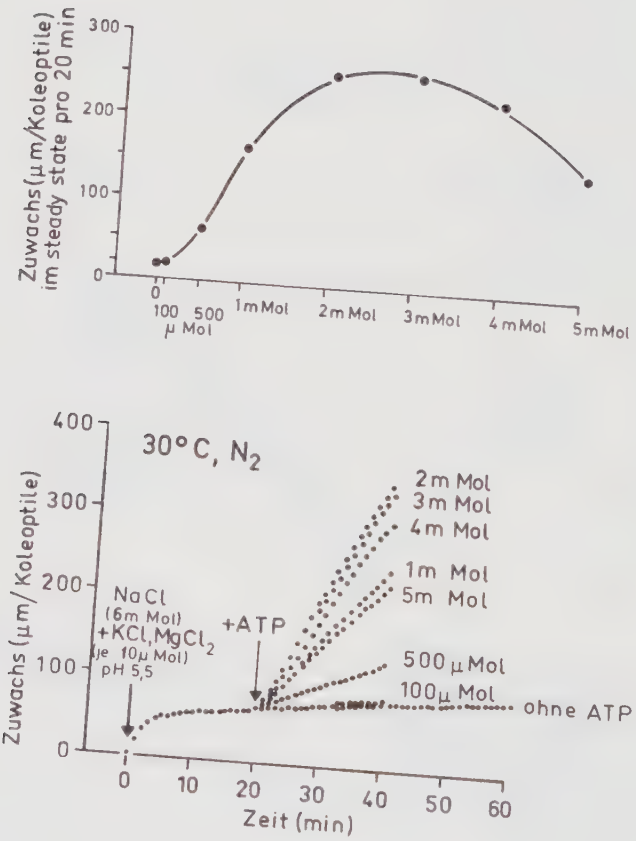


Abb. 22

Konzentrationsoptimum von ATP bei Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose.
(Die Koleoptilen wurden mit IES 10 µMol/l, pH 5,o, in Aerobiose 20 min bei 25°C vorinkubiert.)

durch Zugabe von NaCl konstant gehalten; oberhalb dieser Konzentration nahm er, entsprechend dem ATP-Gehalt, zu. 1 Mol ATP - freie Säure - erfordert zur Einstellung auf pH 5,5 ca. 3 Mol NaOH. Die relative Hemmung durch 5 mMol ATP/l ist wohl z.T. durch die hohe Na^+-Konzentration bedingt.)
100 µMol ATP/l haben unter den gewählten Bedingungen keine meßbare Wirkung auf das SW mehr.

2.2.4. Ersatz von Mg^{++} durch Ca^{++} (Abb. 21 oben)

Wird der ATP-Lösung (enthaltend Na^+ und K^+) anstelle von Mg^{++} (1 mMol/l) dafür Ca^{++} (1 mMol/l) zugegeben, dann wird das SW im Vergleich zur Ca^{++}-freien Kontrolle gehemmt. Eine stark verringerte Ca^{++}-Konzentration (10 µMol) bei konstantem Na^+ und K^+ dagegen fördert das SW im Vergleich zur Ca^{++}-freien Kontrolle.

2.2.5. Konzentrationsoptima von K^+, Mg^{++} und Ca^{++} bei konstanter Na^+- und konstanter ATP-Konzentration (Abb. 23, 24, 25)

Bei konstanter Na^+-Konzentration (6 mMol/l) ist K^+ bzw. Mg^{++} und sogar Ca^{++} allein imstande, das ATP-bedingte SW beträchtlich zu fördern. Das Konzentrationsoptimum liegt bei allen drei Ionenarten bei 10 µMol/l.
Am meisten überrascht die starke Wachstumsförderung durch Ca^{++} (10 µMol/l), das allgemein als wachstumshemmend bekannt ist; allerdings wurden immer nur höhere Konzentrationen untersucht.

2.2.6. Einfluß von K^+, Mg^{++} und Ca^{++} auf das IES-bedingte SW in Aerobiose (Abb. 26 und 27)

Wenn wir annehmen, daß das ATP-bedingte SW auf demselben Mechanismus beruht wie das IES-bedingte, dann müßte das letztere in ähnlicher Weise durch Ionen moduliert werden.

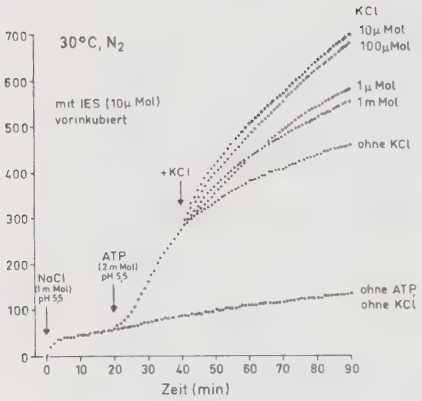


Abb. 23

Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose durch ATP:
Wirkung verschiedener Konzentrationen des Cofaktors K^+.

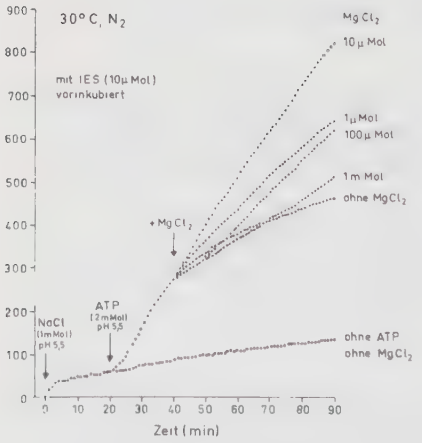


Abb. 24

Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose durch ATP:
Wirkung verschiedener Konzentrationen des Cofaktors Mg^{++}.

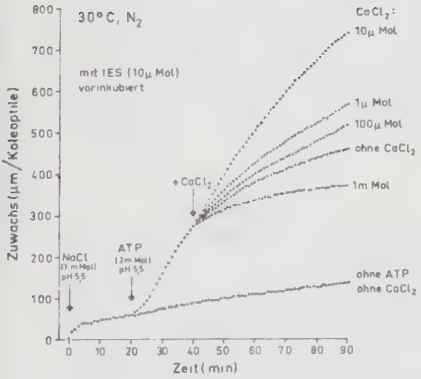


Abb. 25

Wirkung verschiedener Ca^{++}-Konzentrationen auf das durch ATP induzierte SW in Anaerobiose.

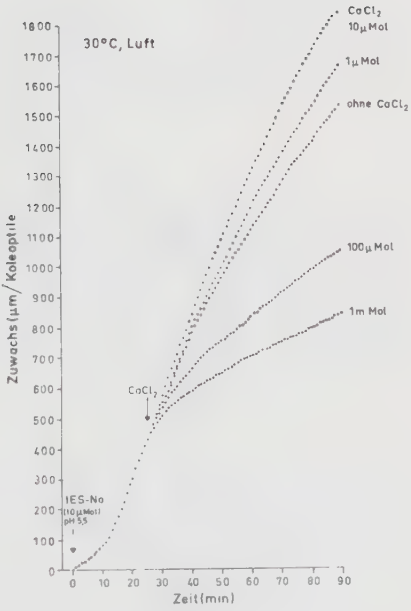


Abb. 26

Wirkung verschiedener Konzentrationen von Ca^{++} auf das IES-bedingte SW in Aerobiose.

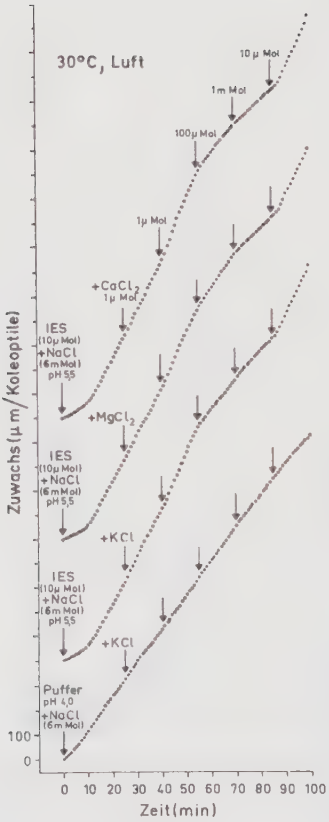


Abb. 27

Wirkung verschiedener Konzentrationen (1 µMol - 1 mMol/l) von Ca^{++}, Mg^{++}, K^{+} auf das IES-bedingte SW.
Untere Kurve: Wirkung von K^{+} auf das säurebedingte SW; dieses wird nicht beeinflußt.

Um dies zu zeigen, werden vergleichbare Versuchsbedingungen gewählt: Die IES-Lösung wird nicht gepuffert, sondern mit NaOH auf pH 5,5 eingestellt, NaCl (6 mMol/l) wird dazugegeben.

In Abb. 26 wird gezeigt, wie außerordentlich ähnlich die verschiedenen Ca^{++}-Konzentrationen auf das IES-bedingte SW wirken, verglichen mit dem ATP-bedingten SW in Anaerobiose (s. Abb. 25). (NaCl wurde diesmal weggelassen.) Hoher Ca^{++}-Gehalt der Lösung (1 mMol/l) wirkt, wie zu erwarten, stark wachstumshemmend.

Wie schnell sich außerdem die IES-Zuwachsrate unter dem Einfluß von K^{+}, Mg^{++} und Ca^{++} verändert, demonstriert Abb. 27. Die Konzentrationsreihe des betreffenden Kations (von 1 µMol bis 1 mMol/l) wurde jeweils an einer Koleoptile ganz durchgemessen; zuletzt wurde zum Vergleich noch einmal die jeweils optimale Konzentration (auch hier wie beim ATP-bedingten SW 10 µMol/l) angewandt.

Wenn ferner die Vorstellung vom SW richtig ist, daß IES bzw. ATP + Cofaktoren am Plasmalemma angreifen und die Zellwandplastizität indirekt verändern, saure Lösungen dagegen direkt auf die Zellwand wirken, dann sollte das säurebedingte SW durch die untersuchten Kationen kaum beeinflußt werden (falls diese nicht den Turgor und die Permeabilität beeinflussen). Am Beispiel von K^{+} wird dies in Abb. 27 (untere Kurve) vorgeführt. (Aus den schon erwähnten Gründen können Erdalkali-Ionen in Pufferlösungen saurer pH-Bereiche schlecht appliziert werden.)

2.3. "Abschalten" des ATP-bedingten SW durch hohen pH-Wert und "Wieder-Anschalten" durch pH 5,5

Ebenso wie das säurebedingte und IES-bedingte SW (s. 1.2. und 1.3.) wird das ATP-induzierte durch stark basischen pH gehemmt und in Lösung vom pH 5,5 wieder gefördert (Abb. 28).

Dies bestätigt die Ansicht, daß Zellstreckung letztlich auf einer pH-abhängigen Änderung der Zellwand-Eigenschaften beruht.

2.4. Hemmung des ATP-bedingten SW durch CCCP

Wenn ATP den hypothetischen Protonenpumpen der Zellmembran als Substrat dient und auf diese Weise Zellstreckung bewirkt, dann müßte die dadurch hervorgerufene Protonen-Akkumulation in bestimmten Zellwand-Kompartimenten durch CCCP ebenso schnell gehemmt werden, wie beim IES-bedingten SW. Abb. 29 zeigt, daß CCCP (10 µMol/l) innerhalb 1-2 min das ATP-induzierte SW "abschaltet". Bei pH 5,0 und 20 min Einwirkung von CCCP kann die Hemmung nicht mehr aufgehoben werden (wegen der schädigenden Wirkung des niederen pH-Wertes, verstärkt durch Anaerobiose), bei pH 6,5 und kürzerer Einwirkung (15 min) ist sie reversibel, wenn zu CCCP-freier Lösung gewechselt wird.

Dieses Ergebnis beweist, daß die Hemmwirkung des CCCP auf das SW nicht primär auf der Entkopplung der Phosphorylierung beruhen kann, denn das Produkt derselben, ATP, steht ja zur Verfügung.

3. "Wieder-Anschalten" des IES-bedingten SW in Anaerobiose durch CTP, GTP, ITP und UTP

Die Nucleosidtriphosphate GTP, ITP, UTP und CTP sind ebenso wie ATP imstande, das durch Anaerobiose gehemmte SW wieder in Gang zu bringen (Abb. 30).
Sie wirken offenbar als ziemlich unspezifische Energielieferanten für das SW unter Anaerobiose (bzw. für die hypothetischen IES-abhängigen Protonenpumpen der Zellmembran).

Unter vergleichbaren Bedingungen (ohne Cofaktoren K^+, Mg^{++}, in eingestellter oder gepufferter Lösung) verursachen ITP

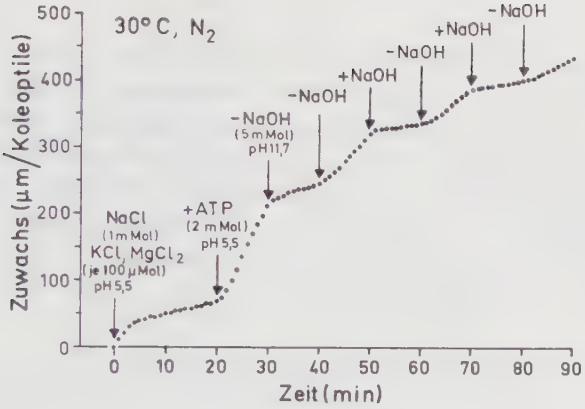


Abb. 28 "Abschalten" des ATP-bedingten SW in Anaerobiose durch basische Lösung (NaOH 5 mMol/l, pH 11,7 + ATP 2 mMol/l). Die Reaktion ist reversibel. (Die Koleoptilen wurden mit IES vorinkubiert.)

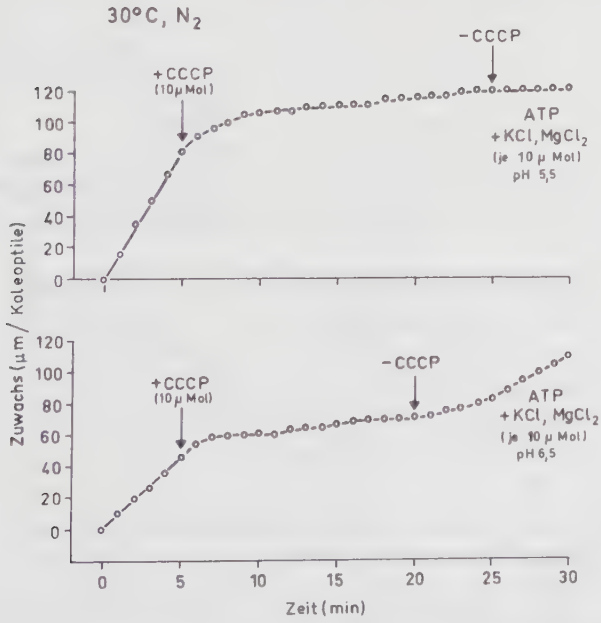


Abb. 29 Hemmung des ATP-bedingten SW in Anaerobiose durch CCCP (10 µMol/l) bei pH 5,5 und 6,5. (Die Koleoptilen wurden mit IES vorinkubiert.)

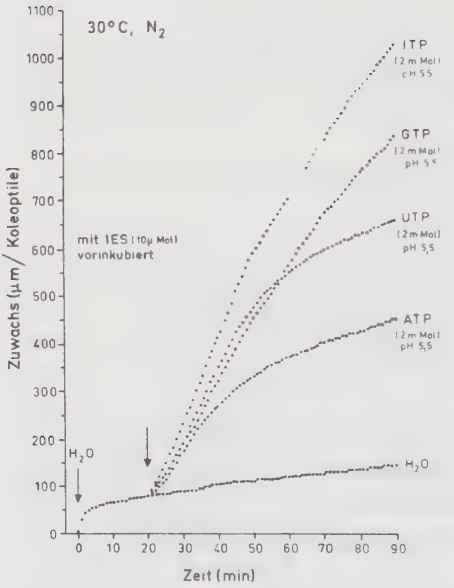


Abb. 30

Aufhebung der Wachstumshemmung in Anaerobiose durch Nucleosidtriphosphate (ATP, UTP, GTP, ITP), je 2 mMol/l, eingestellt auf pH 5,5.

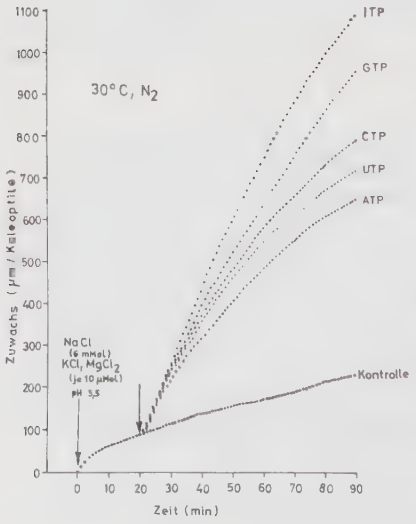


Abb. 31

s. Abb. 30; die Cofaktoren K^+ und Mg^{++} (je 10 µMol/l) wurden zugegeben.

und GTP eine stärkere, nahezu lineare Wachstumsrate, die (bei ITP) fast die Rate des aeroben IES-Wachstums erreicht. Mit ATP, UTP und CTP ist der steady state des SW nach 15 - 25 min beendet. Wie wir in 2.2. gesehen haben, ändert sich das Bild bei Zugabe von Cofaktoren (Abb. 31). Die Wachstumsraten mit ITP und GTP werden durch K^+ + Mg^{++} (je 10 µMol) nur wenig gesteigert, während der steady state des Wachstums mit UTP, CTP und ATP deutlich verlängert wird.

Daß ITP und GTP beim SW eine Sonderstellung innehaben, wird in den folgenden Untersuchungen deutlich.

4. Wirkung der IES-Zugabe unter Anaerobiose in Gegenwart von ATP, UTP, CTP, ITP bzw. GTP

Wird unter N_2 in Anwesenheit von ATP, UTP oder CTP IES zugegeben, so ändert sich die Wachstumsrate nicht (Abb. 32, 33). Mit ITP (GTP) jedoch verringert IES sofort (innerhalb 1 min) die Wachstumsrate der Koleoptile; nach 10 bis 12 min schlägt diese Hemmung in eine Förderung um (Abb. 32, 33, 34, 35).
Das Ergebnis ist das gleiche, wenn ITP (GTP) 20 min nach IES zugegeben wird, bzw. wenn die Cofaktoren K^+ und Mg^{++} anwesend sind. IDP und IMP sind unwirksam (s. Abb. 40 oben).

ITP (GTP) verursacht mit 2,4-D zusammen den gleichen typischen Verlauf der Kinetik wie mit IES, während 3,5-D (das keine Wuchsstoffeigenschaften hat) unwirksam ist (Abb. 36). ITP (GTP) ist demnach notwendig, damit Auxin unter Anaerobiose zur Wirkung kommen kann; es "aktiviert" den Wuchsstoff in einer noch unbekannten Weise.

Die anfängliche Wachstumshemmung nach IES-Zugabe wurde auch von RAYLE et al. (1970a) unter normalen Bedingungen in Luft, bei Maiskoleoptilen und Erbsenepikotylen, beobachtet.
Dieser "falsche Start" des SW ist möglicherweise eine Begleiterscheinung der Konformationsänderung, die nach unserer

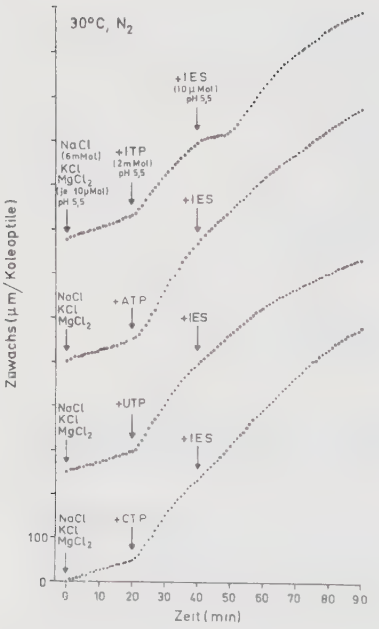


Abb. 32

Wirkung der IES-Zugabe in Anaerobiose in Anwesenheit von ITP, ATP, UTP, CTP (je 2 mMol/l) und Cofaktoren K^+ und Mg^{++} (je 10 µMol/l).

Nur in Anwesenheit von ITP reagiert die Avena-Koleoptile typisch auf IES, und zwar zuerst mit einer Wachstumshemmung und anschließend mit einer Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit.

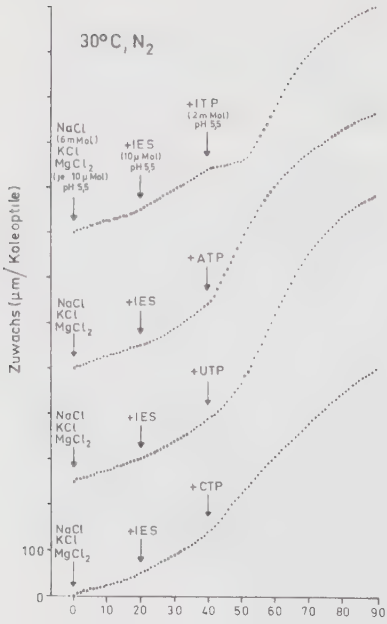


Abb. 33

Wirkung der IES-Zugabe in Anaerobiose; ITP, ATP, UTP, CTP wurden 20 min später zugegeben.

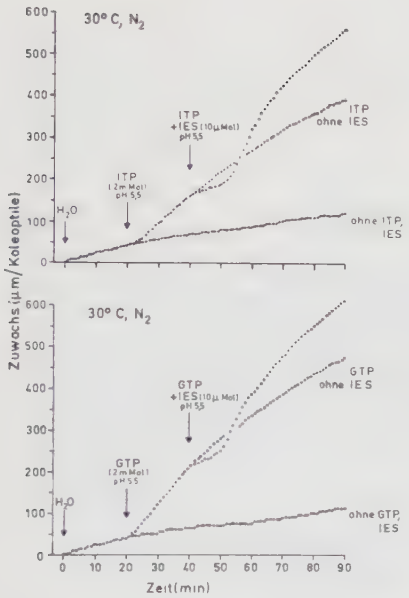


Abb. 34 Wirkung der IES-Zugabe in Anaerobiose in Anwesenheit von ITP bzw. GTP; Cofaktoren (K^+ und Mg^{++}) abwesend

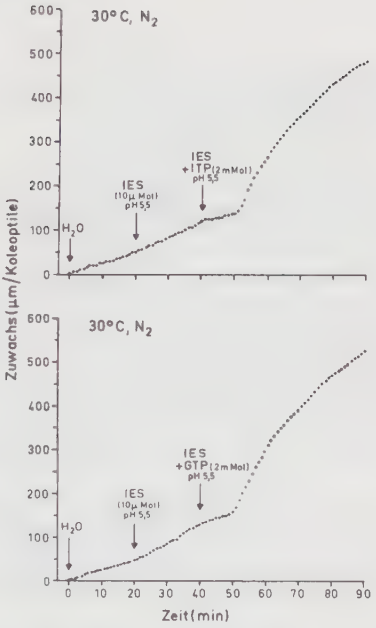


Abb. 35 Wirkung der IES-Zugabe in Anaerobiose, ITP bzw. GTP 20 min später zugegeben; Cofaktoren (K^+ und Mg^{++}) abwesend

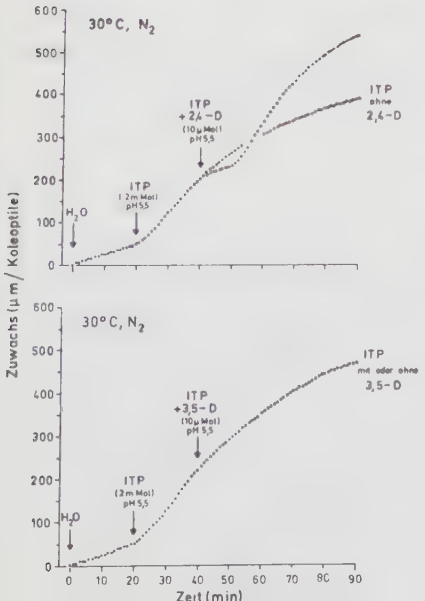


Abb. 36

Wirkung von 2,4-D bzw. 3,5-D in Anaerobiose zugegeben; in Anwesenheit von ITP bzw. GTP.

Cofaktoren (K^+ und Mg^{++}) abwesend.

Nur das als Wuchsstoff wirksame 2,4-D löst eine typische Wachstumsreaktion aus.

Vorstellung die Auxine an den Enzymproteinen der Zellmembran auslösen.

5. Verhalten von ATP und ITP beim SW in Luft

Wenn wir annehmen, daß die Nucleosidtriphosphate, die wir in Lösung zugeben, für die atmungsgehemmte Koleoptile das fehlende Substrat zum Betrieb der energieabhängigen Protonenpumpen ersetzen, dann ist es wahrscheinlich, daß das SW der atmenden Koleoptile (die selbst genug ATP erzeugt) durch Zugabe von ATP u.a. Verbindungen kaum beeinflußt werden kann.

Am Beispiel von ATP und ITP (Abb. 37 und 38) sehen wir, daß sowohl das SW ohne IES-Zugabe wie das IES-bedingte SW in luftgesättigter Lösung kaum mehr gesteigert wird.

Jedoch zeigt ITP auch hier seine besondere Eigenschaft: Es verursacht mit IES zusammen einen "falschen Start" der Wachstumskinetik, die lag phase des IES-bedingten SW wird gewissermaßen "vertieft", die anschließende IES-bedingte Zellstreckung leicht verstärkt (Abb. 38).

Bei 20°C ist die Wachstumshemmung in der lag phase noch deutlicher ausgeprägt (Abb. 39, obere Kurve). ITP wurde hier 20 min vor IES zugegeben.

Doch die lag phase des IES-bedingten SW wird nicht nur durch ITP vertieft, sondern auch verlängert, wenn ITP 20 min nach IES, gerade am Ende der "normalen" lag phase, zugegeben wird (Abb. 39, Mitte). Dieses Ergebnis ähnelt auffallend den Resultaten von RAYLE, EVANS und HERTEL (1970a), die eine Verlängerung der lag phase durch schrittweise Erhöhung der IES-Konzentration ("step up") erzielten.
Nach der lag phase, im steady state des IES-bedingten SW (30 min nach IES-Zugabe), verursacht ITP nur noch geringe kurzzeitige Wachstumshemmung (Abb. 39, unten).

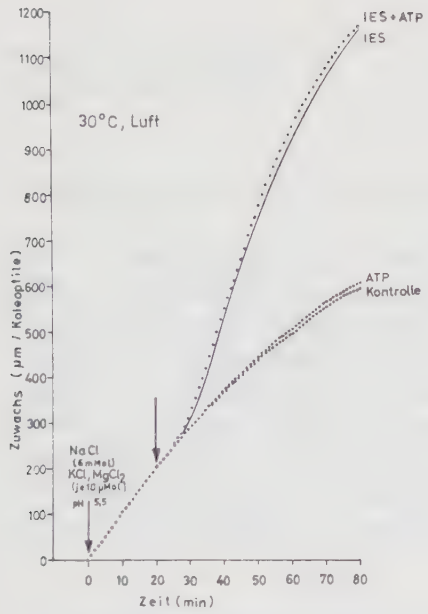


Abb. 37

IES-bedingtes SW bei Anwesenheit von ATP (2 mMol/l) und Cofaktoren K^+ und Mg^{++} (je 10 µMol/l); unter Aerobiose wird durch ATP-Zugabe keine zusätzliche Steigerung des SW erreicht.

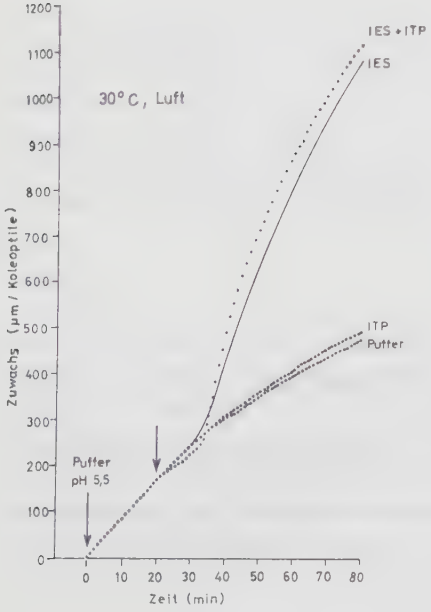


Abb. 38

IES-bedingtes SW in Aerobiose in Anwesenheit von ITP (2 mMol/l) in Puffer (Citratp. pH 5,5, 5 mMol/l). Zugabe von ITP verursacht eine geringe anfängliche Hemmung des SW (vgl. Abb. 32-36).

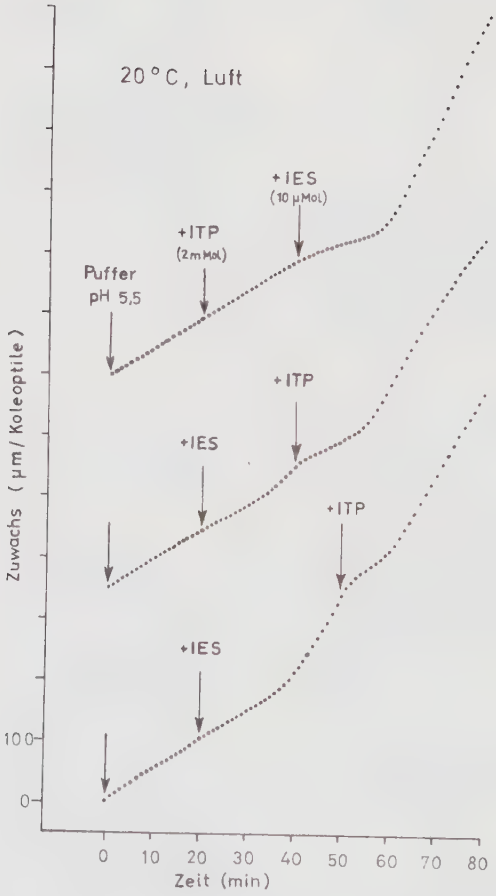


Abb. 39

IES-bedingtes SW in Aerobiose in Anwesenheit von ITP.

Oben: ITP vor IES zugegeben

Mitte: ITP am Ende der lag phase des IES-bedingten SW zugegeben

Unten: ITP in steady state des IES-bedingten SW zugegeben

(IES 10 µMol/l, ITP 2 mMol/l, Puffer: Citratp. pH 5,5, 5 mMol/l)

Temperatur der Lösungen: 20°C.

IDP und IMP beeinflussen den Verlauf des IES-bedingten SW nicht (Abb. 40 unten).

6. Die Wirkung von 3', 5'-AMP auf das SW

KAMISAKA und MASUDA (1970) berichten, daß 3', 5'-AMP die durch 2,4-D bewirkte Wasseraufnahme von Helianthus-tuberosus-Scheiben synergistisch verstärkt. Es handelt sich dabei allerdings um Langzeitversuche (26 h).
In Kurzzeitversuchen ist kein merklicher Einfluß von 3', 5'-AMP auf das SW der Avena-Koleoptile festzustellen (Abb. 41). Vermutlich besteht die Wirkung des 3', 5'-AMP darin, den steady state des auxin-bedingten SW zu "konservieren"; genauere Untersuchungen stehen noch aus.

7. Der "stored growth" -Effekt nach Anaerobiose

Mit "stored growth" bezeichnete RAY (1960) eine Erscheinung, die bei Wachstumshemmung der Avena-Koleoptile durch isotonische Mannitlösung oder KCN-bedingte Atmungshemmung auftritt: Nach Entfernung der Ursache der Wachstumshemmung steigert die Koleoptile die Wachstumsgeschwindigkeit, so daß sie die nichtgehemmte Kontrolle in kurzer Zeit einholt; das während der Hemmung "gespeicherte" Wachstum wird nachgeholt.

Die folgenden Untersuchungen greifen zurück auf 2. und die Abb. 17, in welcher der merkwürdige Verlauf des IES-bedingten SW nach Anaerobiose angedeutet ist.
Wenn die Koleoptile wieder Luft erhält, beginnt sie erneut zu wachsen, und zwar mit größerer Geschwindigkeit als bei der nicht atmungsgehemmten Kontrolle. Nach ca. 10 min verringert sich die Zuwachsrate abrupt auf einen Wert, der unter dem der Kontrolle liegt.

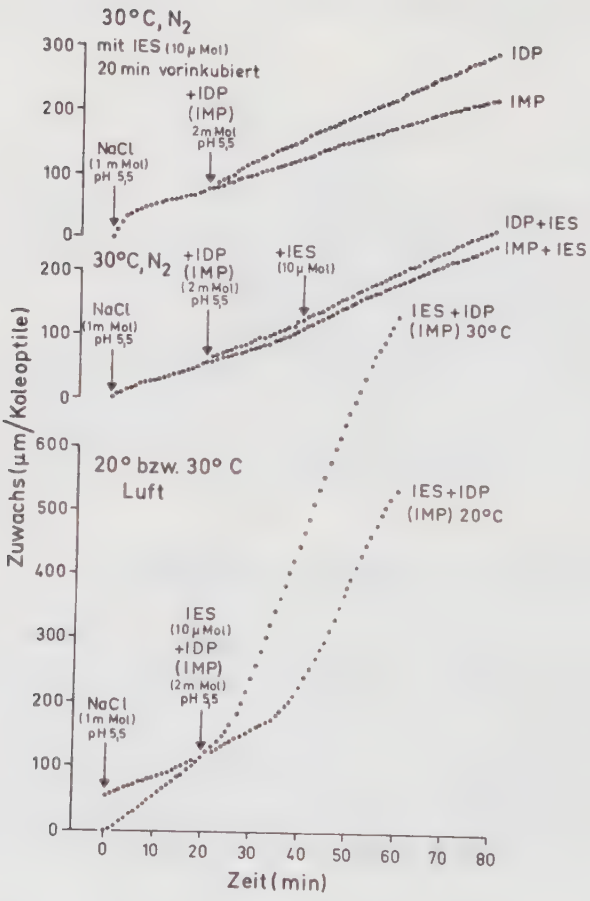


Abb. 40

Wirkung von IDP und IMP (je 2 mMol/l) auf das SW in Anaerobiose und Aerobiose, mit und ohne IES (10 µMol/l). Lösungen mit NaOH bzw. HCL auf pH 5,5 eingestellt.

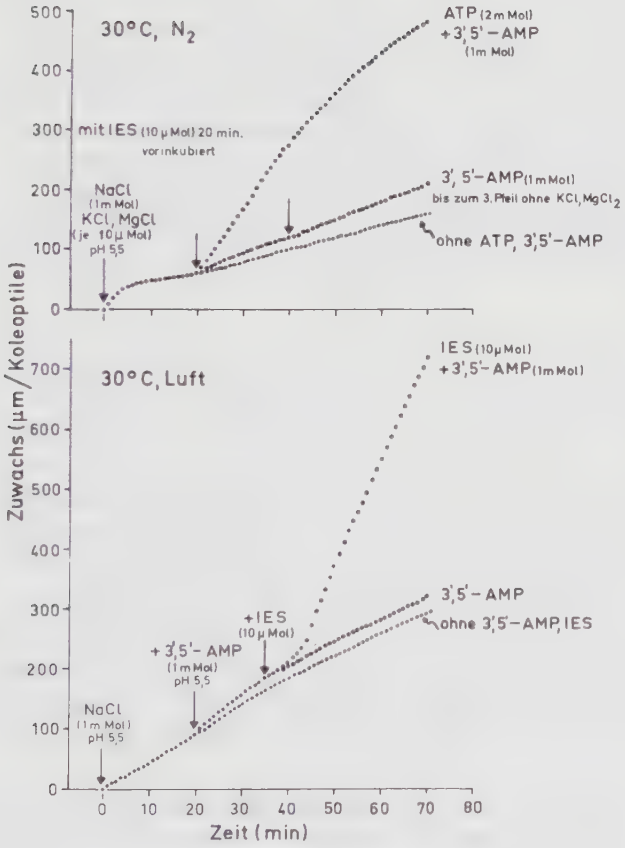


Abb. 41

Wirkung von 3', 5' -AMP auf das SW in Anaerobiose und Aerobiose, mit und ohne ATP bzw. IES.
Zugabe von cyclischem 3',5'-AMP beeinflußt das SW nicht merklich.

Die Abb. 42 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Verlauf des IES-bedingten SW und der Dauer der vorhergehenden Anaerobiose: Die erste Phase (starke Zellstreckung) ist in Rate und Dauer unabhängig von der Dauer der Anaerobiose (5, 10, 15 und 30 min). Die zweite Phase (gehemmte Zellstreckung) sieht nach 5 min Anaerobiose fast wie die Fortsetzung der Wachstumskurve vor N_2-Behandlung aus. Nach 30 min Anaerobiose jedoch beginnt sie mit einer scharfen Hemmung; der weitere Verlauf besteht in unregelmäßigen "Schwingungen" der Zuwachsrate; die ursprüngliche Rate vor der Anaerobiose bzw. die Rate der Kontrolle wird nicht mehr erreicht.

In IES-freier Lösung (Puffer bzw. H_2O) ist der Wachstumsverlauf erstaunlich ähnlich (Abb.43). Auch hier finden wir in der Phase 1 eine zeitlich scharf begrenzte schnelle Zellstreckung. In Phase 2 ist die Wachstumsrate gleich der vor Anaerobiose. Doch der Eindruck von "angestautem Wachstum" ist hier viel stärker: Je länger die Anaerobiose dauert, desto stärker und anhaltender ist die Zellstreckung in Phase 1. (Der Grenzwert ist bei ca. 30 min Anaerobiose erreicht.) Das neue Niveau, auf dem in Phase 2 die "normale" Zellstreckung weitergeht, liegt immer über dem der nicht atmungsgehemmten Kontrolle. Es sieht so aus, als produziere die Koleoptile nach Anaerobiose einen "Überschuß" an Streckungswachstum.
Diese Beobachtung wurde bereits von RAY (1960) gemacht, und zwar an Koleoptilen, deren Atmung und Wachstum reversibel durch KCN gehemmt wurden.

Die beschriebene Reaktion läßt sich an derselben Koleoptile mehrmals hintereinander hervorrufen (Abb. 44).

Die säurebedingte Zellstreckung wird durch Anaerobiose selbst kaum gehemmt, aber durch die folgende Phase 1 erheblich verstärkt (Abb. 45).

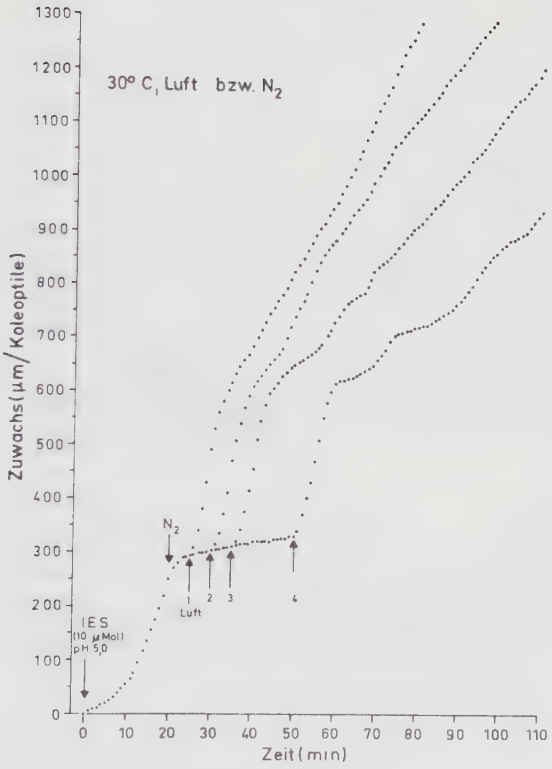


Abb. 42

Der "stored growth"-Effekt in IES-Lösung (10 µMol/l; McIlvaine-Puffer pH 5,0; 7,5 mMol/l) nach Anaerobiose von 5 min (bei 1), 10 min(2), 15 min(3), 30 min(4) bei 30°C.

Nach Anaerobiose läuft eine zeitlich begrenzte Phase schneller Zellstreckung ab, welche von einer zweiten Phase mit verringerter Wachstumsgeschwindigkeit abgelöst wird. Bemerkenswert sind die Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit in Phase 2 nach längerer Anaerobiose.

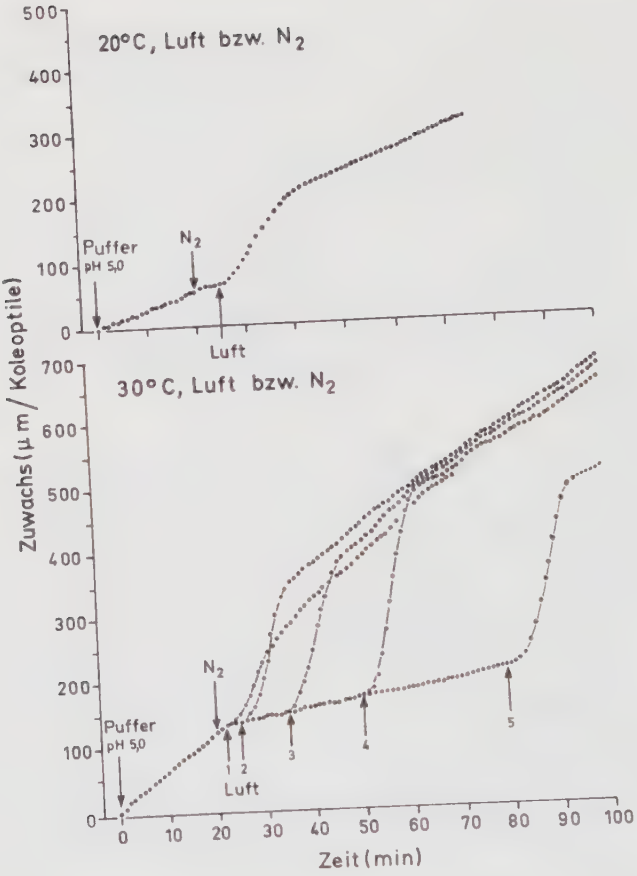


Abb. 43

Der "stored growth"-Effekt in IES-freier Lösung (McIlvaine-Puffer, pH 5,0; 7,5 mMol/l).

Oben: bei 20°C; 5 min Anaerobiose.

Unten: bei 30°C; Anaerobiose 2 min (bei 1), 5 min(2), 15 min(3), 30 min(4), 60 min(5).

Wie in IES-Lösung (Abb. 42) verläuft das SW nach Anaerobiose in 2 Phasen: 1. einer schnellen Zellstreckung und 2. der Rückkehr zur Wachstumsgeschwindigkeit vor Anaerobiose. Während der Phase 1 wird u.a. nach kurzer Anaerobiose ein "Wachstums-Überschuß" produziert.

Werden nach einem luftfreien Vorlauf (20 min) IES + Luft (bzw. IES + ITP oder GTP + Luft) zugegeben (Abb. 46), dann wird nicht nur die lag phase des IES-bedingten SW aufgehoben, sondern auch die bei Zugabe von IES + ITP einsetzende, etwa 10 min dauernde Wachstumshemmung (s. dazu Abb. 34); es bleibt nur eine leichte Depression in der Wachstumskurve übrig, dort, wo die "Nahtstelle" zwischen Phase 1 und der regulären IES-Kinetik zu erwarten ist.
(Die Versuche wurden bei 20°C durchgeführt, um die lag phase des IES-bedingten SW besser sichtbar zu machen.)

Nach diesen Beobachtungen ist zu vermuten, daß während der Atmungshemmung in der Zelle eine Substanz X akkumuliert wird, welche nur in der atmenden Koleoptile Zellstreckung bewirken kann. Ihre Konzentration müßte aber während der Atmung klein sein.

Die Zellstreckung der Phase 1 kann ebenso wie IES- und säurebedingtes SW durch basische Lösung (NaOH, 5 mMol/l) gehemmt werden, sie gehorcht also wahrscheinlich demselben Mechanismus, nämlich der pH-abhängigen Zellwanderweichung als letztem Schritt.

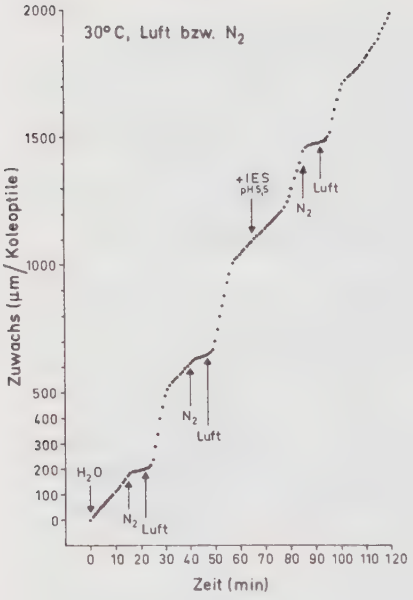


Abb. 44

Wiederholung des "stored growth"-Effektes an der gleichen Koleoptile (2 x ohne IES-Zugabe, 1 x mit IES).

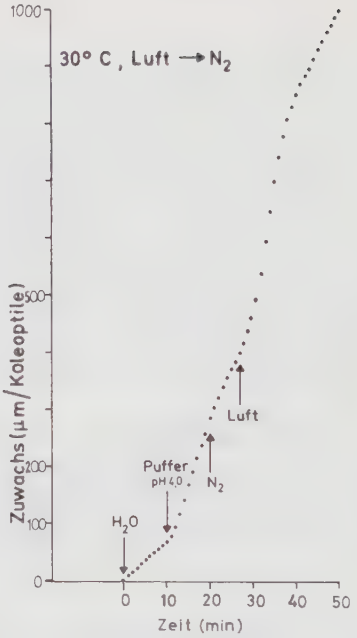


Abb. 45

Verstärkung des säurebedingten SW durch den "stored growth"-Effekt.
(Puffer:McIlvaine, pH 4,0; 7,5 mMol/l)

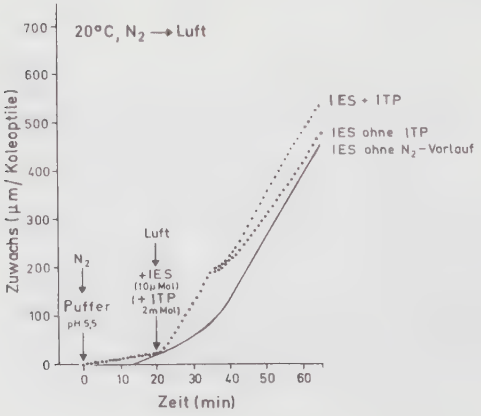


Abb. 46

Dominanz des "stored growth"-Effektes über die lag phase des IES-bedingten SW, mit und ohne ITP (2 mMol/l). (IES 10 µMol/l, McIlvaine-Puffer pH 5,5; 7,5 mMol/l). 20°C.

TEIL II:

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN WUCHSSTOFFATMUNG UND AUXINBEDINGTEM STRECKUNGSWACHSTUM

Einleitung

Das Hypokotyl von Helianthus annuus ist ein Pflanzenorgan, das durch einfache Dekapitation zuverlässig an natürlichem Wuchstoff verarmt werden kann. Es zeigt 3 bis 4 Tage nach dem Abschneiden von Kotyledonen und Primärblättern unterhalb des Kotyledonenansatzes ohne äußere Wuchsstoffzugabe keinen merklichen Zuwachs und keine geotropische Reaktion mehr (BRAUNER u. HAGER 1958).

Mit diesem System läßt sich der Einfluß von Auxinen in mancher Hinsicht besser prüfen, als bei Anwesenheit endogener Wuchsstoffe.

Im folgenden wird zunächst die Kinetik des IES-bedingten Wachstums bei verarmten Hypokotylen untersucht. Eine überraschend lange lag phase bis zum Einsetzen des SW nach Auxin-Zugabe macht dieses Objekt besonders geeignet für die Klärung der Frage nach der zeitlichen Folge von Wachstumsbeginn und Beginn der sog. Wuchsstoffatmung (s. FRENCH a. BEEVERS 1953, BUSSE u. KANDLER 1956, BAYLEY a. SETTERFIELD 1957, NEWCOMB 1960, PILET 1964).
Die auxinbedingte Atmungssteigerung wird im allgemeinen als Sekundärerscheinung des SW betrachtet, und zwar als Energielieferant für Synthesen (Zellwand, Proteine usw.). Das trifft sicher auch zu.

Nach den Ergebnissen in Teil I der vorliegenden Arbeit ist jedoch anzunehmen, daß bereits die Primärreaktion des auxin-

bedingten SW ATP und andere energiereiche Verbindungen erfordert, welche durch die Atmung bereitgestellt werden.
In der Tat fanden MARRÈ und FORTI (1958) bereits 15 min nach IES-Zugabe bei Erbsen-Epikotylen eine signifikante Erhöhung des ATP-Spiegels im Gewebe.
Ob das Auxin dabei direkt oder indirekt auf das Mitochondrien-System wirkt, ist noch unentschieden und soll im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Ein Vergleich der Kinetik der auxin-bedingten Atmungssteigerung mit der Kinetik des auxin-bedingten SW könnte aber zumindest Hinweise darauf liefern, ob die auxin-bedingte Atmungssteigerung an der Primärreaktion der Auxine beteiligt ist, d.h. ob die in Teil I dargelegte Konzeption dieses Vorgangs richtig ist.

Material und Methoden

1. Anzucht von Helianthus annuus (Saatgut von Samen-Schmitz, München)

Die Achaenen wurden mit Leitungswasser gewaschen, auf feuchtem Filtrierpapier im Dunkeln bei 21°C ca. 40 h angekeimt und einzeln in zylindrische Gläschen (2r = 18 mm, h = 40 mm) in Erde eingepflanzt. In einem Anzuchtraum wurden die Keimlinge unter Weißlicht (Tageslicht + Leuchtstoffröhren) von ca. 3000 Lux im Langtag bei 21°C unter konstanten Bedingungen aufgezogen. (Änderungen werden beim betreffenden Versuch angegeben.)
4 Tage nach dem Einpflanzen wurde das Hypokotyl (Länge: ca. 5 cm) für Versuche verwendet.

1.1. Dekapitation und Wuchsstoffverarmung

Der Sproßgipfel (Kotyledonen + Plumula) wurde mit einer Rasierklinge unterhalb des Kotyledonenansatzes abgeschnitten. Die dekapitierten Pflanzen wurden, je nach dem gewünschten "Verarmungsgrad", für 1/2 bis 4 1/2 Tage bei 21°C und 80 % rel. Luftfeuchtigkeit ins Dunkle gestellt.

2. Wachstumsversuche

Alle Versuche fanden bei 21°C statt; sie wurden ausgeführt mit 10 mm langen Hypokotylabschnitten, deren oberes Ende sich bei der dekapitierten Pflanze ca. 5 mm unterhalb der Schnittfläche, bei der intakten entsprechend tief unter dem Kotyledonenansatz befand.

Je 24 Hypokotylabschnitte wurden in Erlenmeyer-Kolben (200 ml, Enghals), die mit Plastikfolie verschlossen wurden, in 50 ml H_2O bidest. oder anderer wuchsstoffreier Lösung 2 h im Dunkeln geschüttelt.

Anschließend wurden die Hypokotylabschnitte mit H_2O dest. abgespült, mit Zellstoff abgetrocknet, auf dünne Glasplatten gelegt und im Schattenrißverfahren fotografiert (durch kurze Belichtung mit einer Glühlampe mit vorgeschaltetem Grünfilter in 1,5 m Entfernung).
Von diesen Fotografien wurde mit einem Teilzirkel die Länge der Versuchspflanzen auf Millimeterpapier übertragen, dabei graphisch summiert und ausgewertet.

Nach der Bestimmung der Ausgangslänge wurden je 24 Hypokotylabschnitte in 20 ml auxinhaltige bzw. Kontroll-Lösung übergeführt. Diese befand sich in Petrischalen (innerer Durchmesser 68 mm) mit eingepaßter durchlöcherter Polyaethylenplatte, mit deren Hilfe die Pflanzen schnell aus der Lösung herausgehoben werden konnten. Die Proben wurden in der Lösung bei 21°C im Dunkeln geschüttelt. 1/4, 1/2, 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Bestimmen der Ausgangslänge wurden die Proben in der beschriebenen Weise fotografiert; für jede dauerte der Vorgang etwa 90 sec.

Durch diese Behandlung wurden die Versuchsergebnisse in keiner Weise verändert, wie Parallelversuche bewiesen, bei denen für jeden Zeitwert eine besondere Probe angesetzt wurde bzw. bei denen nach dem Fotografieren jedesmal die Lösung erneuert wurde.

3. Atmungsmessung

Die Hypokotylabschnitte wurden vor dem Versuch 2 min in Chinosollösung (0,05 %) desinfiziert, um Bakterienwachstum während des Versuches möglichst einzuschränken, dreimal mit H_2O dest. nachgespült und in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Je 6 Abschnitte wurden zusammen abgewogen und in Warburggefäße (Kegelgefäße mit Einsatz und Kipperbirne) eingebracht. Im Hauptraum der Gefäße befand sich 1 ml H_2O bidest., im Einsatz 0,3 ml 10%ige KOH mit einem Filtrierpapierstückchen, bzw. H_2O bei

der RQ-Bestimmung; in der Kipperbirne 1 ml Phosphatpuffer (40 mMol/l; pH 6,0) mit oder ohne IES (20 mg/l = 116 µMol/l; als Kontrolle diente H_2O bidest.

Die Manometer des Warburgapparates wurden alle 30 min abgelesen; 2 h nach Versuchsbeginn wurden die Lösungen aus der Kipperbirne dazugegeben und damit auf die halbe Konzentration verdünnt.
Der O_2-Verbrauch wurde danach 6 1/2 h lang alle 30 min bestimmt.

Der einfache mittlere Fehler der Ergebnisse wurde nach der Formel

$$Fm = \pm \sqrt{\frac{d^2}{n(n-1)}}$$ berechnet.

(Dabei ist d die Differenz zwischen dem Mittelwert und jeweils einer Einzelmessung; n ist die Zahl der Parallelproben.)

Ergebnisse

1. Kinetik des endogenen und IES-bedingten SW bei intakten und verschieden lange "verarmten" Hypokotylen

Wie in "Material und Methoden" beschrieben, wird das SW der Abschnitte aus "intakten" (= unmittelbar vor Versuchsbeginn dekapitierten) und "wuchsstoffverarmten" (d.h. 1/2, 1 1/2, 2 1/2, 3 1/2 und 4 1/2 Tage vor Versuchsbeginn dekapitierten) Hypokotylen bestimmt.

Das Ergebnis ist in Abb. 47 dargestellt:

a) Intakte Pflanzen (i) erweisen sich gegenüber den kurz verarmten (1/2 Tag) mit und ohne IES-Zusatz als wachstumsgehemmt. (Der prozentuale Zuwachs innerhalb von 6 h beträgt mit IES bei intakten Hypokotylabschnitten 19,0 $\pm$ 0,9 %, bei 1/2 Tag verarmten 28,4 $\pm$ 0,3 %, ohne IES 1,5 $\pm$ 0,3 % resp. 2,6 $\pm$ 0,2 %.)

b) Der Gesamtzuwachs (in 6 h) ist umso geringer, je länger die Pflanzen "verarmt" wurden; er nimmt von 1/2 Tag bis 4 1/2 Tagen Verarmungszeit kontinuierlich ab.

c) Die lag phase des IES-bedingten SW dauert umso länger, je länger die Pflanzen verarmt wurden; bei intakten ca. 15 min, bei 1/2 bis 3 1/2 Tage verarmten ca. 30 bis 45 min, bei 4 1/2 Tage verarmten Pflanzen mindestens 1 Stunde.

Der steady state der Zellstreckung beginnt jeweils entsprechend später (bei 4 1/2 Tage verarmten Hypokotylabschnitten erst 2 h nach IES-Zugabe).
Während der lag phase ist vor allem bei stark verarmten Pflanzen in einer Reihe von Proben eine leichte Verkürzung der Hypokotylabschnitte zu beobachten.

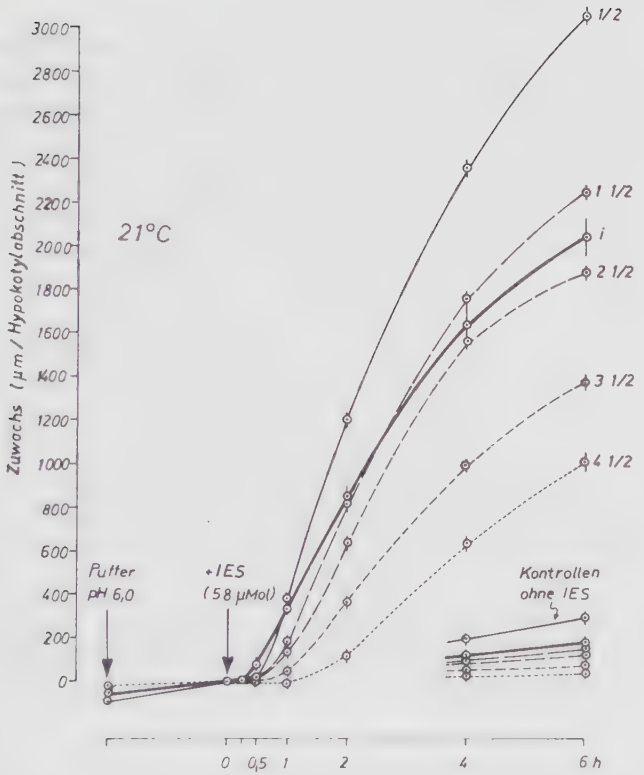


Abb. 47

Kinetik des IES-bedingten SW beim Helianthus-Hypokotyl (Segmente von 10 mm Länge).

Zuwachs der intakten (i) und 1/2, 1 1/2, 2 1/2, 3 1/2 und 4 1/2 Tage verarmten Hypokotylabschnitte.

(Der Vorlauf in Puffer zeigt nicht den absoluten, sondern den prozentualen Zuwachs, bezogen auf den 0-Punkt der Zeitachse.)

Den stärksten Zuwachs (mit und ohne IES) zeigen 1/2 Tag verarmte Hypokotyle; intakte Hypokotyle erscheinen relativ dazu wachstumsgehemmt. Je länger die Pflanzen verarmt wurden, desto länger dauert die lag phase des IES-bedingten SW.

1.1. Endogene Wachstumshemmung intakter Pflanzen und ihre möglichen Ursachen

Als Ursache der unter 1 a) festgestellten Wachstumshemmung intakter gegenüber kurz verarmten Pflanzen könnte man annehmen, daß das Enzym, welches IES durch Kopplung mit Asparaginsäure inaktiviert, in der intakten Pflanze noch aktiver ist als in der dekapitierten. Wäre dies der Fall, so dürfte z.B. mit 2,4-D, einem Wuchsstoff, der nicht auf diese Weise inaktiviert werden kann, der Zuwachs intakter Pflanzen nicht geringer sein als der kurz verarmter (s. ANDREAE a. GOOD 1957).

Der Abb. 48 ist zu entnehmen, daß intakte Pflanzen mit 2,4-D die gleiche relative Wachstumshemmung zeigen wie mit IES.

Eine andere mögliche Ursache dieser Wachstumshemmung könnte der Licht-Dunkel-Rhythmus sein, dem die Pflanzen während der Aufzucht ausgesetzt waren. Die intakten Pflanzen wurden nämlich am Morgen nach der Dunkelperiode zum Versuch verwendet. Die Pflanzen, welche verarmt werden sollten, wurden am Abend nach der Lichtperiode dekapitiert und am nächsten oder einem der folgenden Morgen zum Versuch verwendet. Ihre Kotyledonen waren also vor der Dekapitation 12 Stunden dem Licht ausgesetzt.

Um Auswirkungen dieser Methode auszuschalten, wurden Helianthuskeimlinge in Dauerlicht (weiß, ca. 2600 Lux) aufgezogen. Ein Teil der Pflanzen wurde intakt zum Versuch verwendet, ein anderer Teil zur gleichen Zeit dekapitiert und 24 Stunden im Licht bzw. im Dunkeln verarmt, ein weiterer Teil wurde 12 Stunden später dekapitiert und 12 Stunden im Dunkeln verarmt.

Abb. 49 zeigt das Ergebnis: Die Reaktion der intakten und kurz verarmten Pflanzen auf Auxin ist nach Aufzucht in Dauerlicht die gleiche wie nach Licht-Dunkel-Rhythmus.

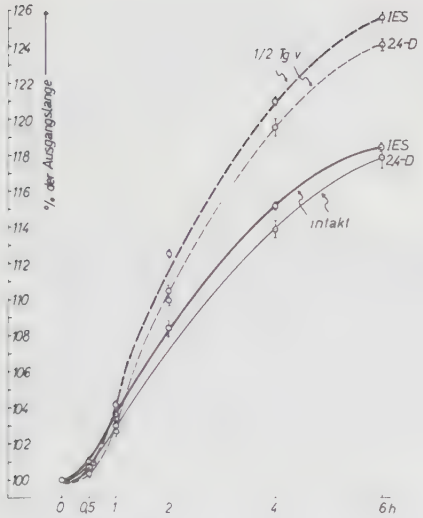


Abb. 48

Zuwachs intakter und 1/2 Tag verarmter Hypokotylabschnitte mit IES (58 µMol/l) bzw. 2,4-D (58 µMol/l) (Phosphatpuffer pH 6,0; 2 mMol/l; 21°C)

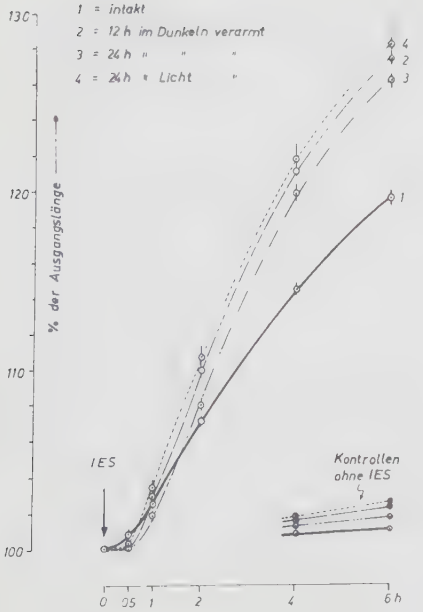


Abb. 49

Zuwachs von Dauerlichtpflanzen (Hypokotylabschnitten) mit IES (58 µMol/l) nach Verarmung im Dunkeln bzw. im Licht (Weißlicht, ca. 2600 Lux).

Außerdem hat die Verarmung im Licht die gleiche Wirkung wie die Verarmung im Dunkeln. Die leichte Wachstumsförderung nach Lichtverarmung im Vergleich zu Dunkelverarmung könnte damit erklärt werden, daß den Hypokotylen noch Photosynthese möglich ist und ihnen folglich mehr Substrat zur Verfügung steht.

Die Wachstumshemmung der intakten gegenüber den kurz verarmten Pflanzen ist also weder auf IES-Inaktivierung mit Asparaginsäure, noch auf Licht-Dunkel-Rhythmik des Wachstums zurückzuführen. Es spielt auch keine entscheidende Rolle, ob im Licht oder im Dunkeln verarmt wird. Es kommt offensichtlich nur auf die Entfernung der Sproßspitze (Kotyledonen + Plumula) an. Welche Rolle die Sproßspitze spielt, wird in Teil III näher untersucht werden.

1.2. Wirkung von Substratzugabe auf das SW stark verarmter Pflanzen

IES-bedingtes SW findet normalerweise nur unter aeroben Bedingungen statt, d.h. wenn energiereiche Verbindungen durch Veratmung von Substrat (Zuckern usw.) produziert werden können (s. Teil I !).
Während der Verarmung des Helianthus-Hypokotyls wird nicht nur der Wuchsstoffgehalt, sondern auch der Gehalt an Reservestoffen geringer. Mikroskopische Schnitte zeigen, daß die Stärkescheide beim 3 1/2 Tage verarmten Hypokotyl fast verschwunden ist; auch der Gehalt des Zellsaftes an reduzierenden Zuckern nimmt ab (HAGER 1962).

Es ist deshalb zu prüfen, ob der geringe Zuwachs stark verarmter Pflanzen durch den schlechten Ernährungszustand bedingt ist. Hypokotylabschnitte von 3 1/2 Tage verarmten Pflanzen wurden 2 Stunden in Glucose-, Saccharose- bzw. Mannitlösung geschüttelt (Saccharose: 10 mMol/l, Glucose: 30 mMol/l) und in die entsprechenden Lösungen mit oder ohne IES übergeführt.

Abb. 50 zeigt, daß das IES-bedingte SW verarmter Pflanzen durch Saccharose (weniger durch Glucose) beträchtlich gefördert werden kann. Selbst die lag phase wird etwas verkürzt.
Das endogene Wachstum (IES-freie Kontrollen) wird durch Zucker nicht merklich beeinflußt.

1.3. Vorbehandlung mit $CaCl_2$-Lösung und ihre Wirkung auf das SW stark verarmter Pflanzen

Daß Ca^{++}-Ionen u.U. das SW fördern, wurde bereits in Teil I demonstriert.
Abb. 51 zeigt, daß 2stündige Vorinkubation 3 1/2 Tage verarmter Hypokotylabschnitte mit $CaCl_2$-Lösung (10 mMol/l, ungepuffert) das anschließende IES-bedingte SW beträchtlich steigern kann. Die "Verarmung" betrifft offenbar auch den Mineralhaushalt, denn bei intakten Pflanzen ist die Wachstumsförderung unter den gleichen Bedingungen viel geringer.

2. Kinetik der IES-bedingten Atmungssteigerung bei intakten und verschieden lange "verarmten" Hypokotylen

Die Atmung wurde gemessen, wie in "Material und Methoden" beschrieben. Der RQ war in allen Fällen 1.

In Abb. 52 a und b ist die Atmungsgeschwindigkeit verschieden stark verarmter Pflanzen in Absolutwerten dargestellt. Bei den IES-freien Kontrollen fällt auf, daß die Atmungsgeschwindigkeit der intakten Pflanzen im Laufe des Versuches absinkt, während sie bei den stärker verarmten Pflanzen merklich ansteigt. Bei diesen wirkt auch der Phosphatpuffer allein atmungssteigernd gegenüber der H_2O - Kontrolle.
Die Grundatmung bei Versuchsbeginn ist umso geringer, je länger die Pflanzen verarmt wurden (s. auch Abb. 53).

Nach Zugabe von IES ist bei allen Proben (selbst bei 4 1/2 Tage verarmten) bereits nach 30 min die Atmung gegenüber den

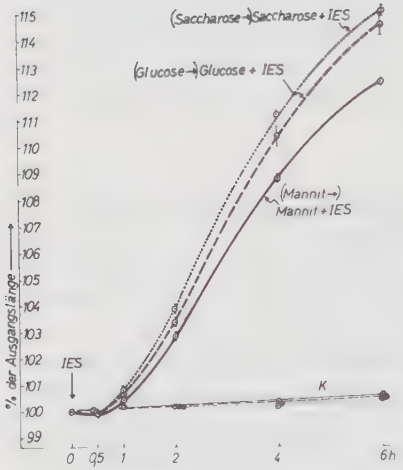


Abb. 50

Zuwachs 3 1/2 Tage verarmter Pflanzen mit IES (58 µMol/l) und Mannit (2 mMol/l) bzw. Saccharose und Glucose (2 mMol/l).
Vorlauf (2h) in Klammer angegeben.

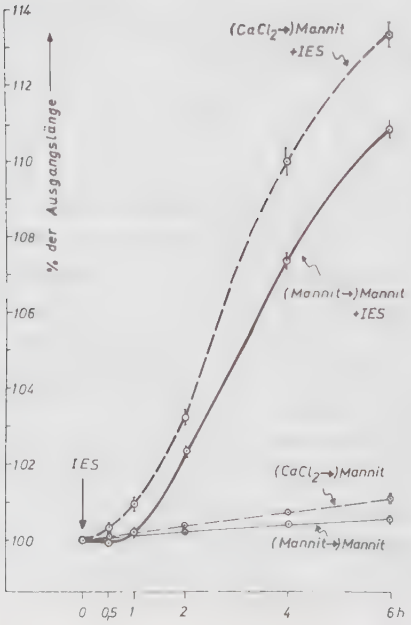
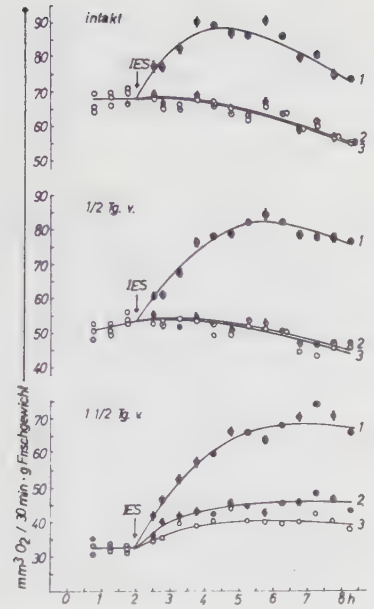


Abb. 51

Wirkung der 2stündigen Vorbehandlung mit $CaCl_2$ (2 mMol/l) auf den Zuwachs 3 1/2 Tage verarmter Hypokotylabschnitte mit IES (58 µMol/l) + Mannit (2 mMol/l).
(Nach der $CaCl_2$-Vorbehandlung waren die Hypokotylabschnitte etwa ebenso lang wie die Kontrollen, so daß die Prozentwerte des Zuwachses etwa den Absolutwerten entsprechen.)



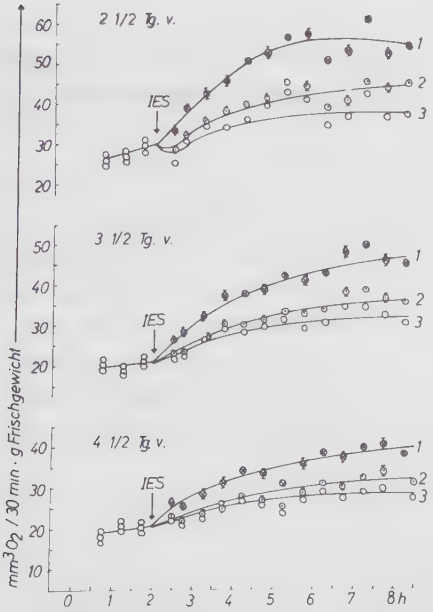


Abb. 52 a und b

Absolutwerte der Atmungssteigerung durch IES (58 µMol/l) bei intakten und 1/2, 1 1/2, 2 1/2, 3 1/2 und 4 1/2 Tage verarmten Hypokotylen.

1: Phosphatpuffer pH 6,0; 2 mMol/l, + IES (58 µMol/l)

2: Phosphatpuffer pH 6,0; 2 mMol/l

3: H_2O dest.

Versuchstemperatur: 21°C

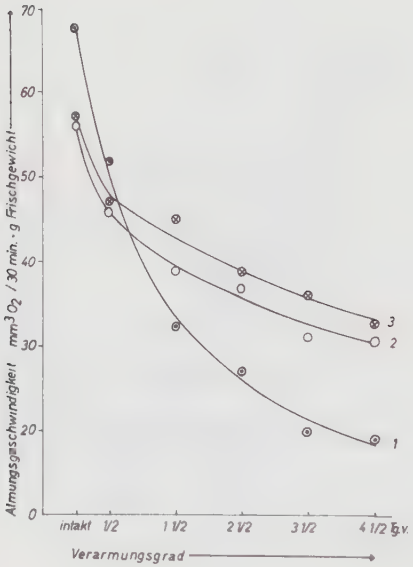


Abb. 53

Durchschnittliche Atmungsgeschwindigkeit (Verbrauch an $mm^3 O_2$/30 min · g Frischgewicht) der verschieden lange verarmten Pflanzen:

1) nach 2 h Vorlauf in H_2O am Anfang des Versuchs
2) in H_2O dest. am Ende des Versuchs (nach 6 h)
3) in Phosphatpuffer am Ende des Versuchs (nach 6 h)

Der durchschnittliche O_2-Verbrauch ist bei intakten Hypokotylen am Anfang des Versuchs größer als am Ende; bei 1 1/2 bis 4 1/2 Tage verarmten Hypokotylen ist es umgekehrt.

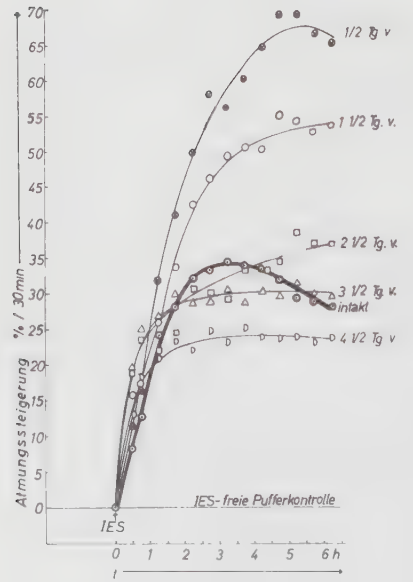


Abb. 54

Prozentuale Steigerung der Atmungsgeschwindigkeit durch IES bei verschieden lange verarmten Pflanzen.
(Die Prozentwerte der Atmungssteigerung sind bei den verschiedenen Verarmungsgraden auf die jeweils dazugehörige Pufferkontrolle bezogen.)
Nach IES-Zugabe auch bei lange verarmten Pflanzen keine lag phase der Atmungssteigerung.

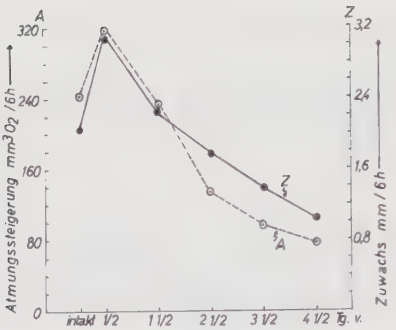
Kontrollen gesteigert. Die stärkste Gesamt-Atmungssteigerung zeigt das 1/2 Tag verarmte Hypokotyl.
Die Berechnung der prozentualen Atmungssteigerung gegenüber der IES-freien Kontrolle (Puffer) zeigt dies deutlicher (Abb. 54).

Die IES-bedingte Atmungssteigerung setzt bei allen Verarmungsgraden sofort ein; sie ist nach 1 h prozentual etwa gleich groß. Je stärker die Pflanzen verarmt sind, desto eher nähert sie sich einem Sättigungswert.
Der Wachstumshemmung der intakten Pflanzen entspricht eine Atmungshemmung gegenüber den kurz verarmten Pflanzen.

In Abb. 55 und 56 sind Wachstum und Atmung in der Gesamtbilanz und während des steady state des Wachstums miteinander verglichen. Sie sind einander direkt proportional. Die höchste Wachstums- und Atmungsrate wird von 1/2 Tag verarmten Pflanzen erreicht.

In Abb. 57 werden die IES-bedingte Atmungssteigerung und die Wachstumsgeschwindigkeit bei den verschieden stark verarmten Pflanzen gegenübergestellt: Die Atmungssteigerung ist selbst bei 4 1/2 Tage verarmten Pflanzen nach 30 min sicher meßbar, während die Zellstreckung erst 1 h nach IES-Zugabe beginnt.

Daraus ist zu folgern, daß die Atmungssteigerung zu den primären Ereignissen beim auxin-bedingten SW gehört.



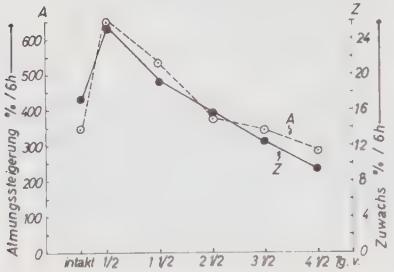


Abb. 55

Vergleich zwischen Gesamt-Atmungssteigerung (A) und Gesamt-Zuwachs (Z) mit IES bei verschieden lange verarmten Pflanzen; Versuchsdauer 6 Stunden.

Oben: Absolutwerte
Unten: Prozentwerte

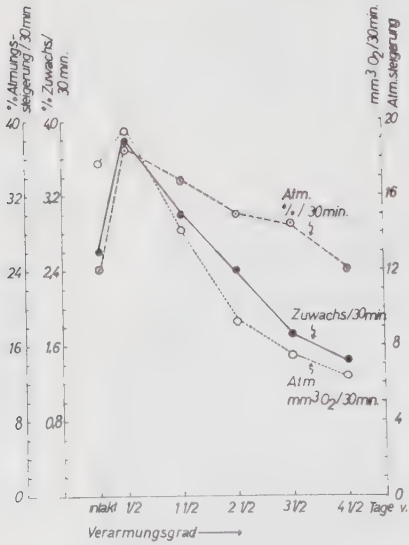


Abb. 56

Vergleich zwischen Atmungssteigerung und Zuwachsrate im steady state des IES-bedingten SW.

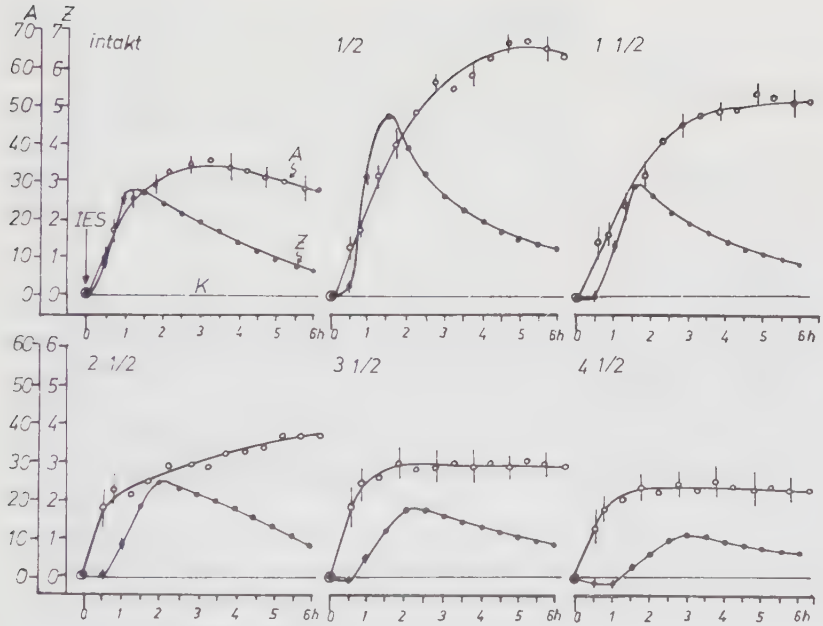


Abb. 57

Vergleich zwischen der IES-bedingten Steigerung der Wachstums- und Atmungsgeschwindigkeit bei intakten und 1/2, 1 1/2, 2 1/2, 3 1/2 und 4 1/2 Tage verarmten Hypokotylabschnitten.
Darstellung in Prozentwerten, bezogen auf die jeweilige Pufferkontrolle.

A = Atmungsgeschwindigkeit (s. Abb. 54) in % / 30 min

Z = Zuwachs in % / 30 min (Die Werte der Wachstumsgeschwindigkeit wurden graphisch aus den Kinetik-Kurven der Abb. 47 abgeleitet.)

K = Pufferkontrolle (Nullinie)

Auch bei stark verarmten Hypokotylen beginnt die auxin-bedingte Atmungssteigerung sofort, d.h. bereits während der lag phase des SW.

TEIL III:

WACHSTUMS-HEMMSTOFFE AUS HELIANTHUS ANNUUS UND IHR WIRKUNGS-MECHANISMUS

E i n l e i t u n g

In Teil II wurde die Frage gestellt, welche Faktoren für die Wachstumshemmung der intakten Hypokotyle gegenüber den kurz verarmten verantwortlich seien.
Die Inaktivierung durch Kopplung der IES mit Asparaginsäure und der Licht-Dunkel-Rhythmus des Wachstums wurden ausgeschlossen (s. Ergebnisse II, 1.1.).
Eine weitere mögliche Ursache wäre die Produktion von Wuchsstoffen in den dekapitierten Hypokotylen, oder aber die Abgabe von Wachstumshemmstoffen von der Sproßspitze an das Hypokotyl, welche durch die Dekapitation unterbrochen wird.

Daß Helianthus-Blätter Wachstumsinhibitoren enthalten, wurde schon von SHIBAOKA und Mitarbeitern (SHIBAOKA 1961; SHIBAOKA et al. 1966) festgestellt. Sie isolierten aus Blättern von Helianthus tuberosus Heliangin, ein Sesquiterpen-Lacton (Strukturaufklärung durch MORIMOTO et al., 1966).

Im folgenden soll untersucht werden, ob die Sproßspitze von Helianthus annuus Inhibitoren bildet und an das Hypokotyl abgibt und dadurch dessen Wachstumshemmung (verglichen mit 1/2 Tag verarmten Hypokotylen) verursacht.

Material und Methoden

1. Anzucht von Helianthus annuus

Die Achaenen wurden in Blechschalen mit Erde (30 x 22 x 4 cm) flächig ausgesät und bis zur "Ernte" unter Dauerlicht (Philips-Leuchtstoffröhren, weiß: TL 40 W/ 21 R, rot: TL 40 W/ 15 R, blau: TL 40 W/ 18 R, jeweils ca. 2000 Lux) bzw. in Dauerdunkel aufgezogen.
Für die Massenisolierung der Inhibitoren wurden die Achaenen im Gewächshaus auf ca. 4 m^2 Fläche in Erde ausgesät und mit Dauerlicht (weiße Atralux-Lampen, 4000 bis 10000 Lux) bestrahlt. Nach dem Auswachsen des 2. Internodiums wurden die 3 Blattpaare oberhalb der Kotyledonen zum Versuch verwendet.

2. Diffusate

Sproßgipfel junger Pflanzen (mit ca. 10 mm langen Primärblättern) wurden unterhalb des Kotyledonenansatzes abgeschnitten, mehrmals mit Leitungswasser und 1x mit H_2O dest. gewaschen und mit Zellstoff vorsichtig abgetrocknet. Je 200 Stück wurden in eine Entwicklerschale (28 x 20 x 5 cm) mit der Schnittfläche nach unten gesetzt. Diese Schale war 1 cm hoch mit H_2O bidest. gefüllt. Die Schalen wurden 6 oder 12 h belichtet (Weißlicht, ca. 3000 Lux), das wäßrige Diffusat abfiltriert (mit Bakterienfilter Seitz K 5) und am Rotationsverdampfer eingeengt (auf 10 ml). Diese Lösung wurde 3 x mit je 25 ml peroxidfreien Aethers ausgeschüttelt, die Aetherphase zur Trockne einrotiert und, je nach Bedarf, mit H_2O (zum Biotest) oder Aethanol (zur Chromatographie) wieder aufgenommen.

3. Gewebe-Extrakte

Die verschiedenen Organe der Helianthus-Pflanze (Kotyledonen, Primärblätter, Hypokotyle) wurden mit 98%igem siedendem Aethanol abgetötet, aufgekocht, abgekühlt, bei $0^{\circ}C$ im Mixer zer-

schlagen, abgenutscht und nachgewaschen (mit 98%igem Aethanol), bis der Rückstand ± farblos war. Die pigmenthaltige Lösung wurde einrotiert (bei höchstens 30°C), bis das Aethanol abgezogen war und eine wäßrige Phase (zumeist aus Gewebswasser stammend) zurückblieb, aus der die Chlorophylle und Carotinoide unlöslich ausfielen. Diese Phase wurde 2x durch Seitz-Filterschichten gepreßt (zuerst durch K 3, dann durch K 5).

Die klare gelbbraune wäßrige Lösung wurde nochmals eingeengt und 3x mit peroxidfreiem Aether ausgeschüttelt. Die Aetherphase wurde einrotiert und mit H_2O bidest. oder Aethanol (98%ig) wieder aufgenommen.

4. Papierchromatographische Trennung der Aetherphase

Sie erfolgte absteigend an Papier Schleicher & Schüll 2043 b.
Laufmittel: Isopropanol : H_2O = 5 : 95 (s. FUKUYAMA a. MOYED 1964);
H_2O-gesättigtes Butanol,
70%iges Methanol (s. SHIBAOKA 1961).

5. Dünnschichtchromatographische Trennung der Aetherphase

Sie erfolgte auf Platten mit Kieselgel MN/UV_{254} (Macherey und Nagel), Schichtdicke 0,4 mm bzw. 1,2 mm (zur chromatographischen Reinigung der isolierten Substanzen).
Laufmittel:
n-Butanon : n-Hexan = 42 : 58
bzw. Aceton : n-Hexan = 40 : 60;
Isopropanol : Butanol : H_2O : NH_3 = 6 : 2 : 2 : 1 (s. DÖRFFLING 1967); Äthylacetat : Benzol = 1 : 1 (v/v); Chloroform; Benzol : Methanol = 9 : 1 (v/v) (s. MITSUHASHI a. SHIBAOKA 1965).

Die Lauffläche wurde nach UV-löschenden Zonen eingeteilt; beim Abkratzen der Platten wurde am Rand ein 1 cm breiter

Streifen stehen gelassen und zum Nachweis der gesuchten Substanzen mit Sprühreagentien behandelt.

6. Sprühreagentien

Die als Wachstumshemmstoffe identifizierten Substanzen ergaben Farbreaktionen mit folgenden Reagentien:

EHRLICH's Reagens (1%ige aethanolische Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd, mit HCl conc. angesäuert)
DMCA (1%ige aethanolische Lösung von p-Dimethylaminozimtaldehyd, angesäuert mit HCl conc.)
SALKOWSKI-TANG-Reagens (3% $FeCl_3$: 35% H_2SO_4 = 1 : 1 (v:v)).

7. Biotest

Dazu wurden 10 mm lange Avena-Koleoptilabschnitte verwendet. Je 20 wurden in Petrischalen (Durchmesser 80 mm) mit 20 ml Testlösung 12 h bei 25°C im Dunkeln geschüttelt.
Testlösung:
Phosphatpuffer (5 mMol/l, pH 5,0) mit oder ohne IES (10 µMol/l), mit oder ohne Ausschnitte aus Papierchromatogrammen bzw. abgekratzte Zonen aus Dünnschichtchromatogrammen.
Die Schattenrißphotographien der Koleoptilabschnitte wurden ausgewertet,wie in II beschrieben.

8. Reindarstellung der Inhibitoren

Die im Laufe mehrerer Wochen gesammelten Inhibitorzonen wurden auf Dünnschicht (Schichtdicke 1,2 mm) rechromatographiert (s. 5.), die fraglichen Zonen abgekratzt und mit peroxidfreiem Aether eluiert. Das Eluat wurde bis auf wenige ml einrotiert und dann mit n-Hexan (Uvasol, Merck) versetzt. Die Inhibitoren fielen als schneeweißer Niederschlag aus. Dieser wurde vorsichtig getrocknet, in Ampullen eingeschmolzen und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Substanzen konnten nicht kristallisiert werden.

Es wurden drei Substanzen mit Inhibitoraktivität isoliert (I_1, I_2 und I_3; s. Ergebnisse).
Aus ca. 10 kg (Frischgewicht) Helianthusblättern wurden 10,2 mg I_1, 15,5 mg I_2 und 31,5 mg I_3 gewonnen. Die Verluste durch Rechromatographie, Reinigung und Lagerung waren vermutlich ziemlich groß (mindestens 50 %). Die Substanzen scheinen chemisch nahe verwandt zu sein und wandeln sich z.T. ineinander um (v.a. I_1 in I_2). I_3 ist die stabilste und wurde deshalb für die Untersuchungen 10 bis 13 allein verwendet.

9. UV - Spektren von I_1, I_2 und I_3

Sie wurden in aethanolischer Lösung aufgenommen.
Meßgerät: Beckman - Spektralphotometer mit Recorder.

10. Massenspektrogramm von I_3

Es wurde freundlicherweise von Herrn Fochler im Anorganisch-Chemischen Institut der Universität München aufgenommen.
5 mg Reinsubstanz wurden eingesetzt. Das Molekulargewicht von I_3 beträgt danach 378.

11. NMR - Spektrum von I_3

Es ist Herrn Huber vom Physikalischen Labor des Organisch-Chemischen Instituts der Universität München zu danken.
Es konnten nur ca. 10 mg Substanz eingesetzt werden.
Leider sind deswegen keine sicheren Aussagen über die Substanz möglich.

12. Decarboxylierung von IES-1-^{14}C in vivo

Die carboxylmarkierte IES wurde von der Fa. Calbiochem bezogen.
Die Methode folgt derjenigen von ZENK (1967a):
Durch zwei parallel geschaltete Reaktionsgefäße (100 ml Weithals-Erlenmeyer-Kolben, je 20 ml Reaktionslösung enthaltend,

durch ein Wasserbad auf 25°C thermostatiert) wird CO_2-freie Luft gepumpt und anschließend durch Vigreux-Säulen mit je 10 ml 10%iger KOH gepreßt. (Laufzeit der Versuche: 6 h).

12.1. Reaktionslösung und Versuchspflanzen

Je 20 ml IES-Lösung (10 mg IES/l = 58 µMol/l, gepuffert mit McIlvaine-Puffer, 10 mMol/l, pH 5,0) enthielten 0,2 µC carboxylmarkierte IES und 100 Helianthus-Hypokotylabschnitte (1o mm lang), außerdem gegebenenfalls den Inhibitor I_3 (100 µMol/l).

12.2. Messung des $^{14}CO_2$

Von der KOH, welche das (durch die enzymatische Decarboxylierung der markierten IES entstehende) $^{14}CO_2$ als $^{14}CO_3^{--}$ enthält, wurde je 1 ml mit H_2O dest. ad 10 ml verdünnt, mit 1 ml gesättigter $BaCl_2$-Lösung versetzt, nach 5 min abfiltriert (mit Spezialnutsche und Glasfaserfilter Whatman GF/C, 25 mm Durchmesser).
Das ausgefällte $BaCO_3$ wurde gewaschen und mit Aceton getrocknet. Die Filterscheibchen wurden auf Planchetten gelegt, im Brutschrank bei 100°C 30 min lang getrocknet, dann mit Uhu-Alleskleber vorsichtig auf die Planchetten geklebt, kurz nachgetrocknet und im Gasdurchflußzähler gezählt.

13. Kurzzeitmessung des SW von Avena-Koleoptilabschnitten nach Zugabe von I_3

Die Methode war die gleiche wie in Teil I.

E r g e b n i s s e

1. Der Inhibitorgehalt von Diffusaten und Gewebeextrakten

1.1. Diffusate

Wenn der Helianthus-Sproßgipfel an das Hypokotyl Wachstumshemmstoffe abgibt, dann wäre es denkbar, daß diese Substanzen auch aus den Schnittflächen abgeschnittener Sproßgipfel herausdiffundieren.
Um dies festzustellen, wurden Diffusate angesetzt (Mat.u. Meth. 2.). Die auf 10 ml eingeengte wäßrige Lösung, die so in 12 h aus 200 Pflanzen gewonnen wurde, wirkte in Vorversuchen stark wachstumshemmend im Biotest. Allerdings ist sie bemerkenswert basisch (pH 8,5) und hat einen hohen osmotischen Wert (kryoskopisch ermittelt: 0,076 bis 0,097 Mol/l).

Sie wurde deshalb 3x mit peroxidfreiem Aether (je 25 ml) ausgeschüttelt. Der Biotest zeigte, daß ca. 90 % der Inhibitoraktivität in die neutrale Aetherphase übergegangen war. Die basischen Substanzen waren in der wäßrigen Phase zurückgeblieben, die in den folgenden Versuchen verworfen wurde.

Die Inhibitor-Aktivität ist ziemlich hitzestabil: Die Hälfte des eingeengten Diffusats wurde 10 min im Wasserbad gekocht. Der Biotest der Aetherphasen des gekochten bzw. rohen Diffusats ergab 44% (gekocht) resp. 51% (roh) Wachstumshemmung gegenüber der IES-Kontrolle.

Im Dunkeln geben abgeschnittene Sproßgipfel weniger Inhibitoraktivität ab als im Licht:
Die Aetherphase des Diffusats von 12 h mit Weißlicht (2000 Lux) bestrahlten Sproßgipfeln hemmte im Biotest das IES-bedingte SW von Avena-Koleoptilen zu 60,5%, die Kontrolle im Dunkeln nur zu 40,4%.

Um Aufschlüsse über Bildungsort und -bedingungen der wachstumshemmenden Substanzen zu erhalten, wurden im folgenden verschie-

dene Organe nach Dauerlicht bzw. Dauerdunkel auf ihren Inhibitorgehalt untersucht.

1.2. Gewebeextrakte und ihr Inhibitorgehalt

6 Tage nach Aussaat und Aufzucht unter weißem Dauerlicht (2000 Lux) wurden je 4 Schalen Helianthus für 4 Tage ins Dunkle gestellt, 4 Schalen im Licht belassen. Von diesen wurde 1 Schale 1 Tag vor dem Versuch dekapitiert.
Je 10 g Frischgewicht von Kotyledonen, Primärblättern, Hypokotylen wurden extrahiert (s. Mat. und Meth. 3.), die Aetherphase wurde biogetestet.

Abb. 58 zeigt, daß die Primärblätter der Dauerlicht-Pflanzen den größten Inhibitorgehalt haben (Hemmung des IES-bedingten Wachstums im Biotest: fast 90 % !), Kotyledonen und Hypokotyl enthalten vergleichsweise wenig wachstumshemmende Aktivität.
Die Inhibitoren des Streckungswachstums werden offenbar nur im Licht gebildet: die Primärblätter der Dauerdunkel-Pflanzen sind inhibitorfrei.

Das 1 Tag verarmte Hypokotyl enthält, wie der Biotest zeigt, wachstumsfördernde Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Soviel jedoch ist daraus zu folgern, daß die Wachstumsraten der intakten bzw. verarmten Hypokotyle nicht nur durch den Gehalt an Hemmstoffen reguliert werden.
Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung der Hemmstoffe, die in der Folge aus belichteten Primärblättern isoliert und chromatographisch getrennt wurden.

2. Extrakte aus belichteten Primärblättern und chromatographische Trennung der Aetherphase

Helianthus wurde, wie in Mat. und Meth. 1. beschrieben, im Gewächshaus gezogen. Die ersten 3 Blattpaare wurden geerntet und extrahiert.

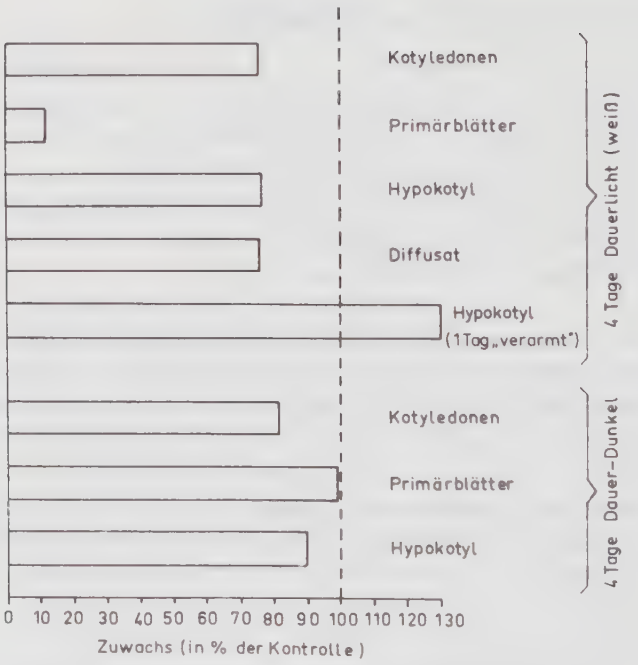


Abb. 58

Der Gesamt-Inhibitorgehalt der Aetherphase von Gewebeextrakten (aus je 10 g Frischgewicht) und einem Diffusat (200 Pflanzen, 6 h mit Weißlicht belichtet), festgestellt im Avena-Biotest.

0 % Zuwachs = Pufferkontrolle
100 % Zuwachs = IES-Kontrolle

Primärblätter belichteter Pflanzen enthalten in der Aetherphase des Extrakts Wachstumshemmstoffe, im Gegensatz zu Primärblättern unbelichteter Pflanzen. Die Aetherphase des Extrakts aus 1 Tag verarmten Hypokotylen fördert das IES-bedingte SW im Avena-Biotest.

2.1. Papierchromatographische Trennung der Aetherphase

SHIBAOKA (1961) fand in Papierchromatogrammen von Helianthusblätterextrakt eine UV-fluoreszenzlöschende Inhibitorzone bei Rf 0,9 bzw. 0,95 (LM Methanol : H_2O = 7 : 3 bzw. H_2O-gesättigtes Butan-2-ol).
Er identifizierte diese nicht weiter untersuchte Zone mit dem aus Hel.-tuberosus-Blättern extrahierten, von ihm so genannten "Heliangin", einem Sesquiterpen-Lacton, dessen Struktur 1966 von MORIMOTO et al. aufgeklärt wurde.

Unter den gleichen Bedingungen zeigten Papierchromatogramme der Aetherphase von Hel.-annuus-Blättern ebenfalls dicht an der LM-Front eine breite Inhibitorzone, die UV absorbiert. Nachweisreaktionen mit Sprühreagentien (DMCA, SALKOWSKI-TANG, EHRLICH's Reagens) ergaben Mischfarben, die vermuten ließen, daß die I-Zone mehrere Substanzen enthielt. Mit dem LM Isopropanol : H_2O = 5 : 95 erschien die I-Zone zwischen RF 0,75 und 0,90.

Die I-Zone wurde ausgeschnitten, mit Aethanol eluiert und das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch weiter aufgetrennt.

2.2. Dünnschichtchromatographische Trennung der I-Zone bzw. der gesamten Aetherphase

Da die gesuchten Substanzen (wahrscheinlich) die UV-Fluoreszenz löschen, wurde als Dünnschichtmaterial Kieselgel mit Fluoreszenzzusatz (KG MN/UV_{254}) gewählt. Es konnte ungepuffert verwendet werden.
Die beste Trennung ergab das LM n-Butanon: n-Hexan = 42 : 58; da n-Butanon aber nur sehr schwer quantitativ aus der Dünnschichtsubstanz entfernt werden kann, wurde es i.allg. durch Aceton ersetzt (LM Aceton : n-Hexan = 40 : 60). Die Trennung war fast ebenso gut, nur die Zonen waren etwas weniger scharf umrissen.

Das fertige Chromatogramm wurde in 18 Zonen, jede ca. 1 cm breit, aufgeteilt, wobei die fluoreszenzlöschenden Zonen als Markierungen dienten.
Ein Teil des Chr. wurde biogetestet, der Hauptteil wurde abgekratzt und jede Zone getrennt aufbewahrt (in Aethanol), die Randstreifen wurden mit Sprühreagentien behandelt.

Abb. 59 zeigt die Auswertung eines repräsentativen Chromatogramms der gesamten Aetherphase des Helianthusblätterextrakts. Die rechromatographierte I-Zone des Papierchromatogramms von 2.1. enthält die UV-löschenden Zonen 12 und 16 nicht, sonst sind keine qualitativen Unterschiede festzustellen.

Im Biotest zeigt sich, daß die UV-löschenden Zonen 4, 6 + 7 (eine Zone, die wegen ihrer Breite im Biotest geteilt wurde) und 8 Wachstumshemmstoffe enthalten. Sie wurden mit I_1, I_2 und I_3 bezeichnet. Das Chromatogramm enthält keine Wuchsstoffzone.
I_1, I_2 und I_3 ergeben mit DMCA, EHRLICH's Reagens und SALKOWSKI-TANG-Reagens charakteristische Farbreaktionen, durch die sie in der Folge identifiziert werden konnten. Bemerkenswert ist, daß I_2 selbst bei großer Substanzmenge nur schwache Farbreaktionen liefert.

3. Reindarstellung und Eigenschaften der Inhibitoren I_1, I_2 und I_3

In ca. drei Monaten wurden rund 10 kg junger Helianthus-Blätter in der beschriebenen Weise extrahiert. Die Aethanol-Eluate der I-Zonen wurden im Tiefkühlfach aufbewahrt und gesammelt. Schließlich wurden die gesammelten Lösungen rechromatographiert (auf KG, LM Aceton : n-Hexan = 40 : 60), wobei eine Reihe von Abbauzonen vor allem bei I_1 und I_2 zum Vorschein kam. Am stabilsten erwies sich I_3.

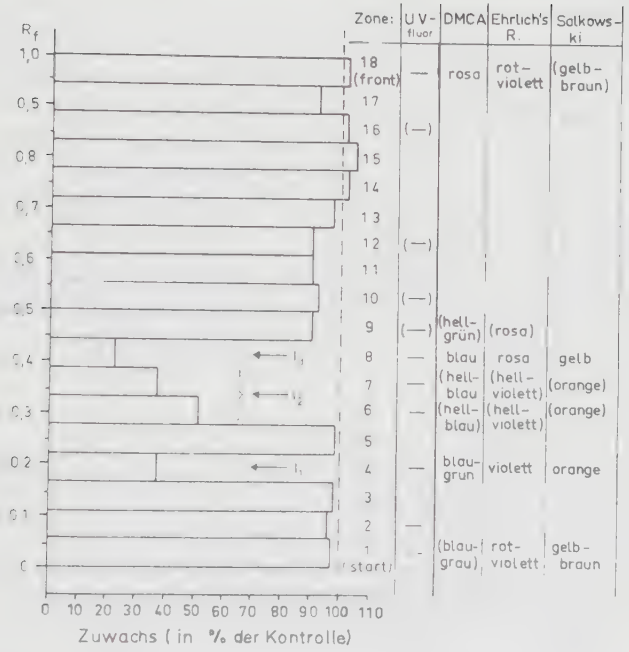


Abb. 59

Dünnschichtchromatogramm der Aetherphase eines Primärblätterextraktes (auf KG 60/UV_{254} mit LM n-Butanon : n-Hexan = 42 : 58).
Nachweisreaktionen und Avena-Biotest.
Die Zonen 4, 6 + 7 und 8 enthalten UV-löschende Substanzen mit wachstumshemmenden Eigenschaften. Sie ergeben charakteristische Farbreaktionen mit DMCA, EHRLICH's Reagens und SALKOWSKI-TANG-Reagens.

3.1. Reindarstellung

Die Aether-Eluate der Zonen I_1, I_2 und I_3 wurden auf je 20 ml einrotiert und mit je 20 ml n-Hexan versetzt. Beim vorsichtigen kühlen Einrotieren (20°C) fielen die drei Substanzen als schneeweiße, nicht kristalline Niederschläge aus. Sie wurden vorsichtig getrocknet und zu je ca. 5 mg in Ampullen eingeschmolzen.
Der Versuch, die Substanzen aus polaren Lösungsmitteln zu kristallisieren, gelang nicht.
Von I_1 und I_2 wurden 10,2 bzw. 15,5 mg, von I_3 31,5 mg rein gewonnen. Alle drei Inhibitoren reagieren in wäßriger Lösung neutral und sind farblos.

3.2. UV-Absorptionsspektren

I_1, I_2 und I_3 wurden in 98 % Aethanol p.a. gelöst (0,1 µMol/l) und die Spektren aufgenommen (Abb. 60).
Überraschenderweise sind die Spektren von I_1 und I_3 identisch. I_2 weicht etwas ab durch eine "Schulter" zwischen 240 und 250 mm. λ max liegt bei allen drei Substanzen in Aethanol bei 212 nm, in H_2O bei 205 nm.

Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß es sich um chemisch nahe verwandte Stoffe handelt. Es schließt weiterhin aus, daß es Stoffe vom Typ des 3-Methylenoxindols sind (λ max bei 248 und 254 nm). Mit Sicherheit ist keine der Substanzen Abscisinsäure (λ max bei 262 nm).

Dagegen stimmt das von MORIMOTO et al. (1966) beschriebene Spektrum von Heliangin (λ max = 207,5 nm) sehr gut mit den bei I_1 und I_3 gefundenen überein. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß es sich um Stoffe der gleichen Verbindungsklasse (Sesquiterpen-Lactone) handelt.

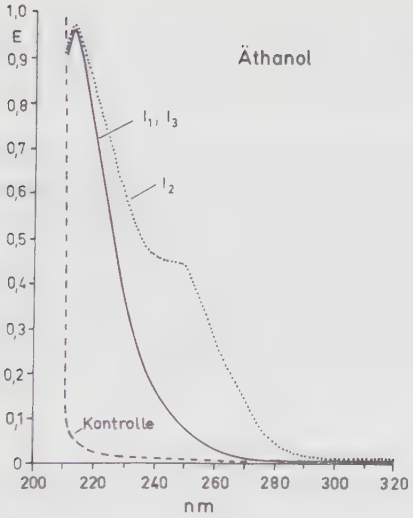


Abb. 60

UV-Absorptionsspektren von I_1, I_2 und I_3 in 98 % Aethanol.
Die Spektren von I_1 und I_3 sind identisch; I_2 hat außerdem eine Schulter bei ~250 nm.

3.3. Molekulargewicht von I_3

Da nur I_3 genügend rein und in großerer Menge präpariert werden konnte, wurde nur von dieser Substanz das Molekulargewicht massenspektrographisch bestimmt. Es beträgt 378; das MG von Heliangin ist nach MORIMOTO et al. (1966) 362.
Das hohe MG von I_3 schließt aus, daß es sich um Abscisinsäure (MG 264) oder 3-Methylenoxindol (MG 145) handelt.

3.4. DS-chromatographischer Vergleich von I_1, I_2 und I_3 mit Portulac-Inhibitor, Heliangin und Xanthium-Inhibitor (nach den Daten von MITSUHASHI a. SHIBAOKA 1965)

MITSUHASHI und SHIBAOKA trennten 1965 die genannten Wachstumshemmstoffe an Kieselgel-Dünnschichten. Nach der Abbildung der Chromatogramme wurden die Rf-Werte der Substanzen ausgemessen und mit denjenigen von I_1, I_2 und I_3 verglichen (Tab. II).

Tab. II Rf-Werte von Portulac-Inhibitor (P), Heliangin (H) und Xanthium-Inhibitor (X) (nach MITSUHASHI a. SHIBAOKA 1965) und I_1, I_2 und I_3.
LM 1 = Aethylacetat : Benzol = 1 : 1 (v/v);
LM 2 = Chloroform;
LM 3 = Benzol : Methanol = 9 : 1 (v/v).

LM :	P	H	X	I_1	I_2	I_3
1	0,12	0,60	0,68 0,74	0,09 (0,17;0,75)	0,17 (0,72)	0,23
2	0,00	0,13	0,30 0,43	0,00 (0,12)	0,00 (0,12)	0,08
3	0,18	0,42	0,60 0,70	0,21 (0,30;0,46; 0,92)	0,28 (0,25)	0,36

Die bei I_1 und I_2 in Klammer angegebenen Zahlen sind die Rf-Werte der (schwächeren) Nebenzonen, die mit EHRLICH's Reagens nachgewiesen wurden. Nur I_3 erwies sich in den drei Chromatogrammen als reine Substanz. Aus I_1 scheint sich im Laufe der Zeit teilweise I_2 zu bilden.

Beim Vergleich der Rf-Werte der Tabelle zeigt sich, daß keiner der gefundenen Inhibitoren bzw. deren Nebenzonen mit Portulac-Inhibitor, Heliangin oder Xanthium-Inhibitor identisch ist.

4. Die Inhibitorbildung in vivo in Dauer-Blaulicht, Dauer-Rotlicht und Dauer-Dunkel

Wie in Mat. u. Meth. beschrieben, wurden je 4 Schalen Helianthus unter Dauer-Blaulicht, Dauer-Rotlicht und in Dauer-Dunkel gezogen. Nach 10 Tagen wurden je 300 g Frischgewicht der gesamten oberirdischen Organe (Hypokotyl, Kotyledonen, Primärblätter) extrahiert und die Aetherphase des Extrakts chromatographiert.

4.1. Der Habitus der Pflanzen bei der Ernte

Dauer-Blaulicht: Länge des Hypokotyls 12 - 15 cm; Kotyledonen ausgewachsen; Kotyl. und Primärblätter waagrecht abstehend; Primärblätter 1,5 - 2 cm lang; Epikotyl 0,3 - 0,5 cm lang, nicht ausgewachsen.
Dauer-Rotlicht: Länge des Hypokotyls 15 - 22 cm; Kotyledonen ausgewachsen, $\pm$ waagrecht abstehend; Primärblätter kleiner als in Blaulicht (1,2 cm lang), senkrecht stehend, geschlossen; Epikotyl ca. 2 cm lang ausgewachsen. Die Pflanzen bieten das Bild teilweisen Etiolements.
Dauer-Dunkel: Länge des Hypokotyls ca. 25 cm; Kotyledonen nicht ausgewachsen, noch geschlossen; Primärblätter 0,3 cm lang; Epikotyl ca. 0,1 cm lang, nicht ausgewachsen. Farbe aller Organe: weißgelblich. Die Pflanzen sind völlig etioliert.

4.2. Der Inhibitorgehalt der Extrakte

Von der Aetherphase der Extrakte aus Blaulicht-, Rotlicht- bzw. Dunkelpflanzen wurde jeweils eine Menge, die 15 g Frischgewicht entspricht, auf 5 cm Startbreite (DS,KG MN/UV_{254}) aufgetragen (LM Aceton : n-Hexan = 40 : 60). Die eine Hälfte jedes Chromatogramms wurde biogetestet, die andere mit EHRLICH's Reagens besprüht.
Zum Biotest wurden nur die UV-löschenden Zonen, die ausschließlich im Rf-Bereich der Inhibitoren und in der Frontzone zu finden waren, verwendet.

Aus Abb. 61 geht hervor, daß sich die Extrakte quantitativ und qualitativ im Hemmstoffgehalt unterscheiden.
In Blaulicht wurde jeweils etwa doppelt soviel I_1, I_2 und I_3 gebildet wie in Rotlicht, was nicht nur der Biotest, sondern auch die Intensität der Farbreaktion mit EHRLICH's Reagens zeigte.
In Dauerdunkel fehlen I_1, I_2 und I_3 völlig.
In Blaulicht ist außerdem an der Front des Chromatogramms ein vierter, sehr wirksamer Inhibitor (I_4) zu finden. Er ist wahrscheinlich nicht mit 3-Methylenoxindol identisch (dieses würde mit dem verwendeten LM etwa bei Rf 0,5 laufen). I_4 fehlt in Rotlicht- und Dunkelpflanzen völlig.
Dauerdunkel-Pflanzen enthalten keine hier nachweisbaren Hemmstoffe, wohl aber eine wachstumsfördernde Substanz (A), die beim Rf von I_3 läuft. Dem Rf nach könnte die Substanz IES sein, diese müßte aber mit EHRLICH's Reagens eine kräftige Farbreaktion geben.

Werden etiolierte Pflanzen kurz (2,5 bis 6 h) mit Licht verschiedener Qualität bestrahlt, dann sind I_1, I_2 und I_3 nur bei Weiß- und Blaulicht nach 6 h in Spuren zu finden; I_4 wird innerhalb von 5 - 6 h in Weiß- und Blaulicht, nicht aber in Rotlicht bzw. Dunkel, in gut nachweisbaren Mengen gebildet.

Vergleicht man abschließend den Habitus der Helianthus-Pflanzen (s. 4.1.) mit ihrem Gehalt an nachweisbaren Inhibitoren,

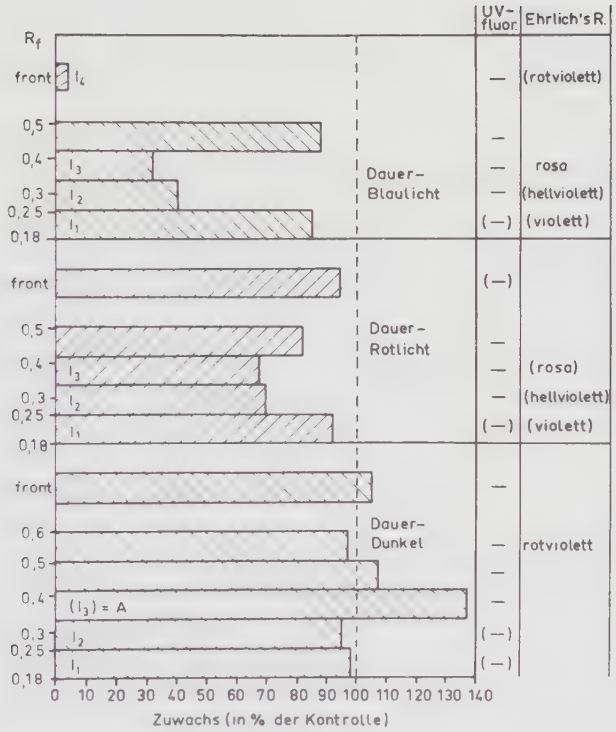


Abb. 61

Dünnschichtchromatogramme der Aetherphasen von Dauer-Blaulicht-, Dauer-Rotlicht- und Dauer-Dunkel-Pflanzen: Biotest und Nachweisreaktionen der Inhibitorzonen und der LM-Front.
Dauer-Blaulicht-Pflanzen enthalten einen zusätzlichen, sehr wirksamen Inhibitor I_4, (etiolierte) Dauer-Dunkel-Pflanzen einen Wuchsstoff.

dann drängt sich der Gedanke auf, daß zwischen beiden ein kausaler Zusammenhang besteht. Wahrscheinlich ist die Bildung von Wachstumshemmstoffen im Licht ein wichtiger Faktor der Photomorphogenese.
Die Frage ist nun, wie die Auxin-Aktivität durch Inhibitoren beeinflußt wird.

5. Die Wirkungsweise des Inhibitors I_3 in vivo

Die Wirkungsmechanismen biogener Wachstumshemmstoffe und Anti-Auxine sind bis jetzt nur zum geringsten Teil bekannt.
Im Falle des Heliangins und verwandter Verbindungen fanden SHIBAOKA und seine Mitarbeiter (1967), daß es in vitro ein Cystein-Addukt bildet; die durch Heliangin verursachte Wachstumshemmung der Avena-Koleoptile wird durch Thiole (z.B. 2,3-Dimercapto-1-propanol = BAL) wieder aufgehoben (SHIBAOKA 1961). Heliangin wirkt also als SH-Gruppen-Reagens, und darauf wird von SHIBAOKA et al. seine Inhibitoreigenschaft zurückgeführt. Diese Diagnose kann richtig sein, sagt aber wenig aus über das System, das durch Heliangin beeinflußt wird, außer daß es wahrscheinlich, wie so viele andere, reaktive SH-Gruppen enthält.

Das am besten untersuchte System, das auch in vitro durch eine Reihe von biogenen Substanzen (Monophenolen bzw. o-Diphenolen) aktiviert bzw. gehemmt wird, ist das der IES-Oxidase (s.z.B. ZENK u. MÜLLER 1963 und 1964; STENLID 1963; KONISHI a. GALSTON 1964; VAN DER MAST 1970 a und b). Die Wachstumshemmung durch Substanzen wie p-Cumarsäure, Phloridzin u.a. würde über die Aktivierung der IES-Oxidase und damit über die oxidative Decarboxylierung der IES, d.h. die Senkung des IES-Spiegels im Gewebe erfolgen.

Es ist deshalb zu prüfen, ob einer der gefundenen Inhibitoren (I_3) als Cofaktor der IES-Oxidase wirkt, d.h. die oxidative Decarboxylierung der IES fördert.

5.1. Decarboxylierung von IES-1-^{14}C in vivo mit und ohne I_3

Nach der Methode von ZENK (1967a) (s. Mat. u. Meth. 12.) wurde die Rate der IES-Decarboxylierung in vivo innerhalb 6 Stunden gemessen. Als Pflanzenmaterial dienten 1/2 Tag verarmte Helianthus-Hypokotylabschnitte (je 10 mm lang). Die Inkubationslösung war gepuffert (pH 5,0) und enthielt 58 µMol/l kalte IES und 10 µC/l IES-1-^{14}C. I_3 wurde in der Konzentration 100 µMol/l zugegeben. Die Ergebnisse von 6 Parallelversuchen zeigt Tab. 3.

Tab. 3 Decarboxylierung von IES-1-^{14}C durch 1/2 Tag verarmte Helianthus-Hypokotylabschnitte mit und ohne Zusatz von I_3 (100 µMol/l), gemessen in ipm

	I_3	Kontrolle
	396	293
	371	263
	405	291
	440	312
	623	446
	618	419
Mittelwert u. Fm	475 ± 46	337 ± 31
Länge der Hyp. nach Versuch	ca. 12,2 mm	ca. 14,1 mm

Die Hypokotyle decarboxylieren in Anwesenheit von I_3 also um ca. 40 % mehr IES als die I_3-freien Kontrollen. Das würde bedeuten, daß I_3 (und evtl. die mit ihm verwandten Substanzen) die Aktivität der IES-Oxidase erhöht.

Wenn die Wachstumshemmung der intakten Hypokotyle (s. Teil II) hauptsächlich auf ihrem Gehalt an Inhibitoren vom Typ des I_3 und deren Wirkung als Cofaktoren der IES-Oxidase beruht, dann müßten intakte Hypokotyle mehr IES decarboxylieren als kurz verarmte Hypokotyle. Das soll im folgenden geprüft werden.

5.2. Decarboxylierung von IES-1-^{14}C durch intakte und 1/2 Tag verarmte Hypokotyle

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie in 5.1.
Tab. 4 enthält die Ergebnisse von 7 Parallelversuchen.

Tab. 4 Decarboxylierung von IES-1-^{14}C durch intakte (i) und 1/2 Tag verarmte (v) Helianthus-Hypokotylabschnitte, gemessen in ipm

	i	v
	293	280
	286	382
	273	472
	401	505
	450	506
	281	495
	269	431
Mittelwert und Fm	322 ± 28	439 ± 31
Länge	ca. 12,8 mm	ca. 13,9 mm

Das Ergebnis ist überraschend: Obwohl intakte Hypokotyle relativ wachstumsgehemmt sind, decarboxylieren sie IES wesentlich schwächer als kurz verarmte Hypokotyle (1/2 Tag verarmte H. decarboxylieren um ca. 35 % mehr).
Es ist nicht wahrscheinlich, daß der Grund hierfür in einer langsameren IES-Aufnahme durch intakte Hypokotyle liegt, denn die lag phase des IES-bedingten Wachstums ist bei diesen kürzer als bei verarmten Hypokotylen (s. Abb. 47).

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint es, als seien die Rate der IES-Decarboxylierung und die Wachstumsrate eines Gewebes nicht unbedingt kausal verbunden. Zu entsprechenden Ergebnissen gelangte bereits STENLID (1963), als er feststellte, daß eine Reihe von Flavonoiden die IES-Oxidase hemmt und zugleich gegen Auxine antagonistisch wirkt, während andere flavonoide IES-Antagonisten die Aktivität dieses Enzyms erhöhen.

Es ist deshalb fraglich, ob die Aktivität der IES-Oxidase entscheidend das auxinbedingte Wachstum des Helianthus-Hypokotyls beeinflußt.
Es ist durchaus möglich, daß die Fähigkeit bestimmter Substanzen, die IES-Oxidase zu hemmen bzw. zu aktivieren, nicht die einzige wachstumsregulierende Eigenschaft dieser Substanzen darstellt.

Wenn die einzige Wirkung von I_3 auf das IES-bedingte Wachstum in der Aktivierung der IES-Oxidase bestünde, dann wäre zu erwarten, daß das SW durch I_3 erst nach einer gewissen Zeitspanne gehemmt wird, dann nämlich, wenn der IES-Spiegel im Gewebe auf ein wachstumsunwirksames Niveau gesunken ist.
Wir müssen allerdings in Rechnung stellen, daß als Oxidationsprodukt der IES das wachstums- und transporthemmende 3-Methylenoxindol im Gewebe entsteht(HAGER u. SCHMIDT 1968 a und b). In diesem Fall würde die Hemmung durch I_3 nicht sofort reversibel sein.

5.3. Kinetik der Wachstumshemmung der Avena-Koleoptile durch den Inhibitor I_3

Von der Substanz I_3 stand nur eine geringe Menge zur Verfügung, so daß nur eine Konzentration (100 µMol/l) getestet werden konnte.

Die Methode folgt der in Teil I angewandten; in Abb. 62 ist das Ergebnis dargestellt.
Die obere Kurve zeigt, daß das IES-bedingte SW nach Zugabe von I_3 sofort gehemmt wird. Nach dem Wechsel zu I_3-freier IES-Lösung wird die normale Wachstumsrate innerhalb von ca. 4 min. wieder erreicht, die Hemmung ist also sofort reversibel.

Analog dazu wird das ATP-bedingte Wachstum (s. Teil I) unter N_2 durch I_3 sofort und ebenfalls reversibel gehemmt (mittlere Kurve der Abb. 62).

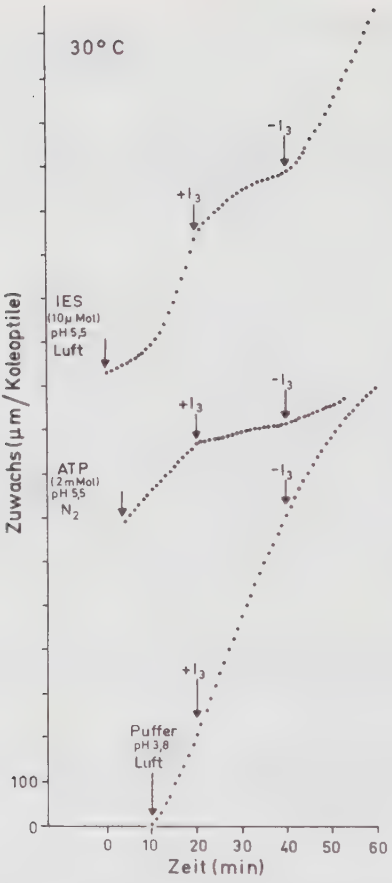


Abb. 62 Hemmung des SW der Avena-Koleoptile durch I_3 (jeweils 100 µMol/l).
Oben: Hemmung des IES-bedingten SW.
Mitte: Hemmung des ATP-bedingten SW in Anaerobiose (Koleoptile nicht mit IES vorinkubiert); Cofaktoren K^+ + Mg^{++} (je 10 µMol/l) zugesetzt.
Unten: Das säurebedingte SW wird durch I_3 nicht beeinflußt.

Die Schnelligkeit, mit der dies geschieht, läßt vermuten, daß es sich dabei um ein allosterisch modulierbares, für das SW wichtiges Enzymsystem handelt. Bei der Untersuchung der Wachstumshemmung durch Abscisinsäure gelangte NISSL (1970, Dissertation) zum gleichen Schluß.
IES und ähnliche Auxine wären dabei als Effektoren, I_3 und andere biogene Wachstumshemmstoffe als allosterische Inhibitoren anzusehen.

Daß I_3 anders in den Mechanismus des Streckungswachstums eingreift als CCCP (s. Teil I, 1.5 und 2.4; Abb. 13, 14, 15, 16, 29), zeigt die untere Kurve der Abb. 61.

Die säurebedingte Zellstreckung (s. Teil I, 1.ff) wird durch I_3 (100 µMol/l) überhaupt nicht beeinflußt, während sie durch CCCP nach einiger Zeit gehemmt wird.
I_3 scheint also nicht über eine Permeabilitätsveränderung zu wirken, wie es bei CCCP der Fall ist. Der Befund spricht weiter dafür, daß durch I_3 die zellwanderweichenden Enzymsysteme, welche auch durch saure Lösungen aktivierbar sind (s. Teil I, 1.; Abb. 2, 3, 6, 7), nicht direkt beeinflußt werden können. Dafür spricht auch, daß I_3 seine Eigenschaften in saurer Pufferlösung offenbar nicht verändert, denn die UV-Absorptionsspektren gleicher Mengen von I_3 sind in McIlvaine-Puffer vom pH 4,0 und in H_2O dest. qualitativ und quantitativ gleich. Die Unwirksamkeit von I_3 beim Säurewachstum ist auch sicher nicht damit zu begründen, daß I_3 bei pH 4 nicht vom Gewebe aufgenommen wird: Ein Biotest mit IES-Lösung vom pH 4,1 (gepuffert), mit und ohne I_3, und mit Pufferlösung vom pH 4,1, mit und ohne I_3, zeigte, daß I_3 nicht den saurebedingten Zuwachs, wohl aber den darüber hinausgehenden IES-bedingten Zuwachs reduziert.

Daraus ist zu schließen:
I_3 macht die Zellmembran nicht durchlässig für H^+-Ionen, d.h. es wirkt nicht auf die Permeabilität ein.

I_3 wirkt nicht direkt auf die Enzymsysteme, welche die Zellwandplastizität verändern.

I_3 bewirkt vielmehr wahrscheinlich eine (allosterische) Hemmung der in Teil I geforderten Ionen- bzw. Protonenpumpen, für welche Auxin als positiver Effektor fungieren soll.

D I S K U S S I O N

Das auxin-induzierte Streckungswachstum Höherer Pflanzen ist ein komplexer Vorgang.
Über die Ereignisse, welche im Cytoplasma durch Auxin ausgelöst werden, ließen sich bisher nur Vermutungen anstellen. Aber auch über die einfacher meßbaren Veränderungen der Zellwand bestehen noch wenig exakte Vorstellungen.

Die auxin-bedingten Änderungen der Zellwandeigenschaften verlaufen in zwei Phasen: Erstens einer "Zellwanderweichung" (d.h. der Erhöhung der elastischen und plastischen Dehnbarkeit) und dem Einbau neuen ZW-Materials.
(Über die kausale Beteiligung des letzteren an der Zellstreckung sind die Ansichten verschieden; es ist wohl anzunehmen, daß die ZW-Neusynthese eine Folge der Zellstreckung ist. Vgl. RAY 1960, RAY a. BAKER 1962, WILSON 1964).

Die Zellwanderweichung scheint die Hauptvoraussetzung dafür zu sein, daß die Zelle ihr Volumen in Längsrichtung vergrößern kann. Dabei sind zwei Komponenten zu unterscheiden, nämlich die plastische und die elastische Dehnbarkeit der Zellwand.
Die Plastizitätserhöhung wurde seit Beginn der Wuchsstoffphysiologie immer wieder nachgewiesen (HEYN 1931, 1940; BRAUNER a. BRAUNER 1943; BRAUNER u. HASMAN 1952; CLELAND 1965, 1967 a; MENZEL Diss. 1966; COARTNEY et al. 1967; MASUDA 1965, 1968; HAGER et al. 1971). Mit der Methode der Resonanz-Frequenz-Messung hat UHRSTRÖM (1969) gezeigt, daß die Elastizität des Gewebes bereits 5 min nach Auxin-Zugabe zunimmt, und schließt daraus, daß eine Primärwirkung der Auxine in der Lockerung der Zellwandmatrix besteht.
Die Indizien häufen sich, daß dies durch zellwandeigene oder -nahe Enzyme geschieht (MENZEL, Diss. 1966; COARTNEY et al. 1967; CLELAND 1967a;MASUDA 1968; TANIMOTO a. MASUDA 1968; MORRÉ a. EISINGER 1968; MASUDA et al. 1970). Beim Pollenschlauchwachstum fanden ROGGEN und STANLEY (1968) additive

Wachstumsförderung durch ß-1,4-Glukanase und Pektinase. HEYN (1970 a und b) wies nach, daß isolierte und gereinigte Avena-Zellwände Dextrane in Lösung spalteten.

Da Auxine auf die Plastizität der Zellwände keinen direkten Einfluß haben (FREY-WYSSLING 1950), stellt sich die Frage, wie die Auxine die Aktivität der Zellwandenzyme indirekt beeinflussen können.

Dafür gibt es zwei Möglichkeiten:
Die Neusynthese von Enzymen
und die Abgabe von enzym-aktivierenden Agentien vom Cytoplasma an die Zellwand.

Neusynthese von Enzymen ist sicher eine der indirekten Auxin-Wirkungen und ist, nach den Befunden mehrerer Autoren, notwendig, um das SW über längere Zeit aufrechtzuerhalten (s. z.B. COARTNEY et al. 1967). Wenn SW und Zellwanderweichung jedoch durch Antibiotica nach einiger Zeit gehemmt werden, so kann es sich um Sekundäreffekte handeln, die nicht eindeutig den Schluß zulassen, daß bei der Primärwirkung des Auxins die RNA- bzw. Proteinsynthese eine Rolle spielt. Diese Hemmstoffe der RNA- und Proteinsynthese haben Nebenwirkungen, die von sich aus das Wachstum stören können: Actinomycin D erhöht die Permeabilität der Membranen, z.B. für den Farbstoff Betacyan (MENZEL Diss. 1966), Cycloheximid hemmt die Aufnahme von K^+ und Phosphat bei Hefezellen und entkoppelt die oxidative Phosphorylierung (REILLY et al. 1970; ELLIS a. MACDONALD 1970; s. Einleitung Teil I!).

Die Schnelligkeit, mit der auxin-bedingtes Wachstum in Gang gesetzt werden kann (s. NISSL, Diss. 1970; NISSL a. ZENK 1969) schließt aus, daß die Primärwirkung der Auxine in der Neusynthese von zellwanderweichenden Enzymen besteht.

Die Primärwirkung der Auxine im Zellwandbereich kann deshalb nur eine Aktivierung bereits vorhandener Enzyme sein.

Die vorliegende Arbeit stellt eine Verbindung her zwischen dieser Feststellung und einer längst bekannten Beobachtungstatsache: der Beeinflussung des SW durch den pH der Versuchslösung (s. BONNER 1934; VAN SANTEN, Diss. 1940; POHL 1948; ANKER 1958; SEGAL 1960; HAGER 1962; RAYLE a. CLELAND 1970; RAYLE et al. 1970; GANOT a. REINHOLD 1970; HAGER et al. 1971).

Wie in Teil I dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Förderung des Streckungswachstums durch saure Lösungen von pH 3,7 - 4,1 unabhängig vom Metabolismus der Zelle (solange der Turgormechanismus nicht geschädigt wird), im Gegensatz zum auxin-bedingten Wachstum. Saure Lösungen erhöhen die plastische Dehnbarkeit von Zellwänden, auch wenn eine Beteiligung des Cytoplasmas durch energische Plasmolyse ausgeschaltet wird (MENZEL Diss. 1966; HAGER et al. 1971; s. auch Teil I, 1.).

H^+-Ionen aktivieren also wahrscheinlich direkt die (hypothetischen) zellwanderweichenden Enzyme, während die Auxine zunächst im Cytoplasma eine Reaktion in Gang setzen, zu der die Zellatmung nötig ist, die aber zum gleichen Resultat, der Zellwanderweichung, führt.

Auxin-bedingtes und pH-bedingtes SW können beide in gleicher Weise durch hohen pH reversibel "abgeschaltet" werden: ein Indiz dafür, daß die (indirekte) Auxin-Wirkung auf die Zellwand die gleiche ist wie die direkte von sauren Lösungen.

Das bedeutet aber, daß das Plasmalemma unter Auxin-Einfluß Protonen nach "außen" pumpen müßte.
Daß solche anisotropen energieabhängigen Pumpen in Membranen existieren, ist vielfach nachgewiesen oder zumindest wahrscheinlich gemacht worden (z.B. bei Streptococcus faecalis, HAROLD a. BAARDA 1968; HAROLD et al. 1970; bei Escherichia coli, PAVLASOVA a. HAROLD 1969; bei Gerstenwurzeln, PITMAN 1970; bei Rattenleber-Mitochondrien und Chloroplasten, MITCHELL 1967; REID et al. 1966; bei Chloroplasten, HAGER 1969;

bei Seeigeleiern, NAKAZAWA et al. 1970). Die Translokation von Protonen quer zur Membran ist dabei meist gekoppelt an den Transport von anderen Kationen (Na^+, K^+, Ca^{++}) in Gegenrichtung.

Bei allen erwähnten Systemen (mit Ausnahme des letztgenannten der Seeigeleier, bei dem die Wirkung von CCCP nicht untersucht worden war), wurde der aktive gerichtete Protonentransport durch Entkoppler, z.B. CCCP und Homologe, unterbrochen. Dabei erhöht CCCP (und andere Entkoppler) die Membranpermeabilität spezifisch für H^+ und OH^-, wie von HOPFER und Mitarbeitern (1968) auch an in vitro-Systemen (Phospholipid-Doppelschicht-Membranen) gezeigt werden konnte. Die beim aktiven Transport auf einer Membranseite akkumulierten Protonen fließen folglich zurück.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß das IES-bedingte SW durch CCCP sofort gehemmt wird (wobei die oxidative Phosphorylierung noch nicht entkoppelt wird).
Das ist eine weitere Stütze für die vorgetragene Modellvorstellung vom SW.

Erwartungsgemäß verläuft die Kinetik der CCCP-bedingten Hemmung des säurebedingten SW aber anders: Da vom Außenmedium Protonen im Überschuß zur Verfügung stehen, wird die Zellstreckung (als Folge pH-bedingter Zellwanderweichung) solange nicht gehemmt, bis das Cytoplasma durch CCCP und damit durch einströmende Protonen geschädigt wird.

Die erwähnten Protonenpumpen der Mitochondrien und Chloroplasten sind ATPasen (MITCHELL 1967; REID et al. 1966), d.h. sie benötigen ATP (oder andere Nucleosidtriphosphate) als Substrat.
ATPasen finden sich aber auch im Plasmalemma von Pflanzenzellen. HALL (1970) und HALL u.BUTT (1969) wiesen nach, daß die Zellwandfraktion von Gerstenwurzeln (die wahrscheinlich das Plasmalemma mit enthielt, Anm. d. Verf.) 20 % der gesamten ATPase-

Aktivität des Homogenats enthält. Solche ATPasen werden durch Ca^{++}, Mg^{++}, Na^{+} und K^{+} aktiviert. FISHER und HODGES (1968) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Von HALL (1969) wurde die ATPase-Aktivität der Zelloberfläche auch cytologisch nachgewiesen.

Bei etiolierten Avena-Koleoptilen, wie sie für Wachstumsversuche verwendet werden, wird ATP hauptsächlich durch die Atmung erzeugt. Wenn die Atmung gehemmt wird, z.B. durch Atmungsgifte wie KCN (RAY 1960; RAY a. RUESINK 1962) oder durch O_2-Entzug (RAY a. RUESINK 1962; vorliegende Untersuchungen), kommt das SW innerhalb weniger Minuten fast zum Stillstand. Auch die IES-bedingte Zellwanderweichung wird durch KCN verhindert (CLELAND 1965, 1968).
Es liegt nun nahe anzunehmen, daß die hypothetischen Protonenpumpen bei Atmungshemmung aus Substratmangel ihre Tätigkeit einstellen.

In den vorliegenden Untersuchungen gelang es, nach O_2-Entzug das SW durch Zugabe von ATP und anderen Nucleosidtriphosphaten wieder in Gang zu bringen.
(Von außen gegebenes ATP kann auf die lebenden Zellen offenbar einwirken, z.B. beim Rattenmuskel, s. CHAUDRY a. GOULD 1970; bei Wurzelhaaren der Gerste, in denen es die Schnelligkeit der Plasmaströmung steigert, s. POP et al. 1967; bei Avena-Koleoptilen, wo es die Aethionin-induzierte Wachstumshemmung aufhebt, s. NORRIS 1964; bei Helianthus-Hypokotylen, in denen es den IES-Transport um 100 % steigert, s. REIFF u. GUTTENBERG 1959, 1961; bei Vallisneria-Blattstücken, wo es die Starklichtbewegung der Chloroplasten beeinflußt, s. SEITZ 1971.)

Dabei wirken Kationen (K^{+}, Mg^{++}, Ca^{++}) als Cofaktoren. Ihre optimale wachstumsfördernde Konzentration ist bemerkenswert gering: sie liegt bei 10 µMol/l, bei K^{+} zwischen 10 und 100 µMol/l.
Hohe Konzentrationen von Ca^{++} (1 mMol/l) hemmen die Reaktion der atmungsgehemmten Koleoptilen auf ATP, geringe Konzentrationen (10 µMol/l) fördern sie ebenso stark wie Mg^{++} und K^{+}.

Die Wirkung ist teilweise additiv.

Die Cofaktoren K^+, Mg^{++} und Ca^{++} modulieren im gleichen Sinne auch das aerobe IES-induzierte SW. Das säurebedingte Wachstum wird, zumindest durch K^+, nicht beeinflußt.

Überraschend ist vor allem die starke Wachstumsförderung durch niedere Konzentrationen von Ca^{++}. In allen bisherigen Untersuchungen über die Ca^{++}-Wirkung (s. z.B. PICKARD 1970) stand die Wachstumshemmung so sehr im Vordergrund, daß eine Hypothese der Auxin-Wirkung (die "Calciumbrücken-Hypothese") darauf errichtet wurde (vgl. BENNET-CLARK 1955; COOIL a. BONNER 1957; BONNER 1961). Allein BURSTRÖM (1964) wies darauf hin, daß bei Ca-Mangel-Pflanzen Ca^{++} das SW fördert. UHRSTRÖM (1969) findet, daß Ca^{++} in allen Konzentrationen die Zellwandelastizität verringert und die Zellwand versteift; aber bei seiner Methode der Resonanz-Frequenz-Messung an lebendem, nicht plasmolysiertem Gewebe gehen auch die Eigenschaften des Cytoplasmas (Turgor etc.) in den resultierenden Meßwert ein. MENZEL (Diss. 1966) findet keinen Einfluß von Ca^{++} auf die Dehnbarkeit der Zellwände plasmolysierter Helianthus-Hypokotyle.

Die Kationen K^+, Mg^{++} und Ca^{++} haben möglicherweise beim SW die gleiche Funktion wie bei den oben aufgezählten Protonenpumpen-ATPasen: sie werden im Austausch gegen H^+ in die Zelle aufgenommen (den Beweis dafür müßten erst tracer-Versuche liefern!).
Es ist dabei wahrscheinlich, daß im Plasmalemma mehrere Arten von Protonenpumpen-ATPasen existieren, die durch bestimmte Ionen stimuliert und vielleicht durch andere Ionen gehemmt werden (s. ROSENTHAL et al. 1970, die eine Ca^{++}-aktivierte, Mg^{++}-gehemmte ATPase beschreiben). Vielleicht sollte in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß Li^+ die auxin-bedingte Wasseraufnahme durch Kartoffelknollen- oder Topinamburknollengewebe (die dem SW entspricht) und die auxin-bedingte Atmungssteigerung hemmt (SPERLING a. LATIES 1963).
(Ca^{++} und K^+ in hohen Konzentrationen fördern im übrigen auch

die Zellwand-Neubildung isolierter Tomaten-Protoplasten, s. POJNAR a. COCKING 1967.)

Welche Funktion haben nun die Auxine in dem hypothetischen System?
ATP hebt die Wachstumshemmung in Anaerobiose, zumindest teilweise, auf. Wenn die Koleoptilabschnitte in Aerobiose mit IES vorinkubiert worden waren, ist dieser ATP-Effekt um das 2 - 3 fache verstärkt:
Der IES-Gehalt der Koleoptile ist der limitierende Faktor der Reaktion, oder anders ausgedrückt: IES könnte als (allosterischer) Effektor, ATP als Substrat der Reaktion wirken (vgl. dazu die Modelle allosterischer Regulation von MONOD et al. 1963 und MONOD et al. 1965).
(Daß die allosterische Konformationsänderung von Enzymen am SW ursächlich beteiligt ist, zeigt die Hemmung des IES-bedingten SW durch D_2O, welches diese Konformationsänderungen bekanntlich verhindert, s. DAHLHELM 1969).

Schwerer zu interpretieren als der ATP-Effekt ist die spezielle Reaktion der Avena-Koleoptile auf ITP und GTP.
In Anaerobiose zugegebene IES löst bestenfalls die Andeutung einer Wachstumsförderung aus; auch die Anwesenheit von ATP (CTP, UTP) ändert daran nichts. Mit ITP oder GTP aber entsteht das typische Bild einer IES-Wachstumskinetik: eine lag phase, in der die Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Vorlauf sogar deutlich reduziert wird, anschließende Steigerung der Zuwachsrate bis zum (kurzdauernden) steady state, und schließlich Abklingen der Reaktion.

In Aerobiose scheint die endogene ATP-Konzentration optimal zu sein bzw. sich dem Bedarf anzupassen, denn zugegebenes ATP bewirkt keine weitere Steigerung des endogenen und IES-bedingten SW (bei höheren äußeren ATP-Konzentrationen wird das endogene SW gelegentlich sogar gehemmt). Auch die lag phase des IES-bedingten SW wird durch ATP nicht beeinflußt.
Zugabe von ITP dagegen hat eine charakteristische Wirkung:

Zugleich mit IES gegeben, bewirkt es einen "falschen Start" des SW, d.h. in der lag phase vermindert sich die Wachstumsrate gegenüber dem Vorlauf (s.o.!).
Am Ende der lag phase zugegeben, vermag es diese um das Doppelte zu verlängern. Das erinnert an die gleiche Erscheinung beim "step up" in der Auxin-Konzentration, die von RAYLE et al. (1970 a) beschrieben wurde.

Das führt zum Schlüsselproblem des Auxin-induzierten SW:

Was geschieht in der lag phase?

Daß sofort nach Zugabe von IES + ITP (GTP) im Membran- und Zellwandbereich eine Reaktion erfolgt, zeigt der "falsche Start", d.h. die Wachstumshemmung (s.o.). Lange verarmte Helianthus-Hypokotyle schrumpfen gelegentlich leicht während der lag phase: ein Hinweis darauf, daß der Turgormechanismus in Mitleidenschaft gezogen ist. Nach UHRSTRÖM (1969) beginnt die Elastizitätserhöhung der Zellwand einige min eher als die Zellstreckung, nach MORRÉ und EISINGER (1968) sogar sofort nach IES-Zugabe.
Im Zusammenhang mit dem "falschen Start" sollte auch der "paradoxe Wuchsstofftransport" in den ersten 10 - 15 min der geotropischen Exposition (s. FILNER a. HERTEL 1970) und die von BRAUNER u. ZIPPERER 1961 beschriebene positive Krümmung in der Anfangsphase der geotropischen Reaktion erwähnt werden.

Was sich auf molekularer Ebene abspielt, liegt noch im Bereich der Spekulation. Eine Denkmöglichkeit wäre:
Während der Konformationsänderung der Membran-ATPasen durch den (allosterischen) Effektor IES entsteht ein instabiler Membran-Zustand: die Permeabilität für H_2O und gelöste Stoffe ändert sich vorübergehend, der Turgor nimmt ab. Dadurch kann sich die Zellwanderweichung noch nicht auf die Zellstreckung auswirken.
Schaltprozesse in biologischen Membranen und die damit verbundenen reversiblen Strukturumwandlungen werden in neuerer Zeit an in vitro-Modellen untersucht.

An Lipid-Modellmembranen zeigte TRÄUBLE (1971) Phasenumwandlungen durch Temperaturerhöhung, Änderung der Salzkonzentration und des pH-Wertes. Dabei konnten beachtliche Permeabilitätsänderungen beobachtet werden.
Es ist durchaus denkbar, daß in vivo eine Konformationsänderung im Protein-Anteil der biologischen Membran sich vergleichbar auf die Membraneigenschaften auswirkt.
(Man sollte im übrigen nicht vergessen, daß die plötzliche Applikation von Wuchsstoff ein eigentlich unphysiologischer Vorgang ist, den es in der Natur in der Form nicht gibt.)

Im Hinblick auf die Primärwirkungen des Auxins sollten hier noch die Ergebnisse von NEUMANN (1971) erwähnt werden: IES stimuliert den Einbau von $^{32}PO_4^{3-}$ bereits während der lag phase des SW in eine noch unbekannte, Glycerin und Phosphat enthaltende Verbindung.
Diese hat ein Molekulargewicht über 5000 und soll den Teichonsäuren der Bakterien ähnlich sein, welche u.U. die Aktivitäten membrangebundener Enzyme zu beeinflussen vermögen. Ein Zusammenhang mit den oben aufgefuhrten Ergebnissen kann allerdings noch nicht hergestellt werden.

In der lag phase des SW wird die Atmung offenbar bereits gesteigert, d.h. die ATP-Produktion wird erhöht, wie die Befunde bei Helianthus zeigen. Bei Erbsen-Epikotylen fanden MARRE und FORTI (1958) schon 15 min nach IES-Zugabe einen erhöhten Spiegel der Nucleosidtriphosphate bzw. des ATP.

Die IES-bedingte Atmungssteigerung ist seit langem ein strittiger Punkt in der Wuchsstoffphysiologie. Im allgemeinen wird sie als Folge des Energiebedarfs beim Einbau neuen Zellwandmaterials interpretiert (BUSSE u. KANDLER 1956; BAYLEY a. SETTERFIELD 1957), aber auch gegenteilige Gesichtspunkte wurden vorgetragen: ANKER (1953) fand, daß alte, nicht mehr wachstumsfähige Gewebe nach IES-Zugabe noch Atmungssteigerung zeigen. Die Atmung bzw. ATP ist für das Wachstum notwendig (s. FREY-WYSSLING 1950; FRENCH a. BEEVERS 1953, SPERLING a. LATIES 1963), schon weil die IES-Aufnahme oder -Abgabe und der polare Transport energie-

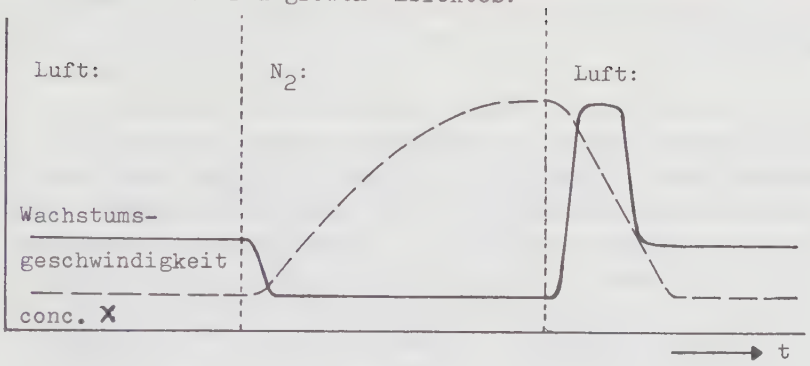
abhängig sind und durch Anaerobiose gehemmt werden (GOLDSMITH 1968). Atmungshemmung durch KCN macht die IES-bedingte Zellwanderweichung sogar rückgängig (CLELAND 1968).

Die Atmungssteigerung muß demnach mit der Primärwirkung der Auxine zusammenhängen.
Sie könnte direkt oder indirekt durch die Auxine gesteuert werden:
Für die direkte Wirkung der Auxine auf die Atmung hat SARKISSIAN Beweise gesucht (MITCHELL a. SARKISSIAN 1966; SARKISSIAN 1968) und fand die allosterische Aktivierung der Citratsynthase durch IES. Dieser Befund blieb allerdings nicht unwidersprochen (s. ZENK a. NISSL 1968); die Sachlage ist noch nicht geklärt. BAXTER und HANSON (1968) fanden keinen direkten in vitro-Einfluß von 2,4-D auf isolierte Mitochondrien von Sojabohnen-Hypokotylen, wohl aber bemerkenswerte Veränderungen an den Mitochondrien, die nach 24 h 2,4-D-Einwirkung in vivo isoliert wurden: diese waren größer und bauten stärker Aminosäuren in Protein und Phosphat in Phospholipide und RNA ein.

Nach Atmungshemmung tritt eine der merkwürdigsten Erscheinungen beim SW auf: der "stored growth"-Effekt, besser gesagt: ein Wachstums-Überschuß, den die Koleoptile produziert, wenn sie wieder atmen kann. Dieser ist besonders auffällig beim "endogenen" Wachstum ohne IES-Zugabe nach kürzerer Anaerobiose (5 - 30 min). Er ist zeitlich scharf begrenzt und in Dauer und Stärke temperaturabhängig. Anwesenheit von ATP, UTP, ITP, GTP, ADP, AMP, 3', 5'-AMP, IDP, IMP ändert nichts an der Erscheinung. Es sieht so aus, als würde eine wachstumsfördernde Substanz X während der Anaerobiose akkumuliert, welche ihre Wirkung nur in Aerobiose ausüben kann, wobei ihre Konzentration sehr schnell wieder abnimmt (s. Schema auf S. 109!)

Daß nach Aufhebung einer Atmungshemmung mit KCN (durch Entfernen von KCN) ein plötzlicher Wachstums-"Puls" erfolgt, wurde bereits von RAY (1960) beschrieben. Eine genauere Untersuchung dieser Erscheinung könnte möglicherweise einen Einblick in die Zusammenhänge zwischen Atmung und SW geben.

Schema des stored growth- Effektes:



Das SW der Pflanzen wird unter anderem auch durch biogene Hemmstoffe reguliert, deren Angriffspunkte im Zellstoffwechsel zum größeren Teil noch unbekannt sind. Im III. Teil dieser Arbeit wurden darüber einige Untersuchungen durchgeführt.

Soweit bis jetzt untersucht, sind diese chemisch sehr vielfältigen Substanzen mitverantwortlich für Morphogenesen bei höheren Pflanzen. Ihre Entstehung in vivo wird u.a. durch Licht beeinflußt.
3-Methylenoxindol zum Beispiel kann durch enzymatische oder Photooxidation der IES im Gewebe entstehen (s. TULI a. MOYED 1967, HAGER u. SCHMIDT 1968); es scheint für phototropische Krümmungen mitverantwortlich zu sein, indem es den IES-Transport auf der Lichtflanke der Pflanzenorgane hemmt.
Auch die wahrscheinlich ubiquitär vorkommende Abscisinsäure (ABS) findet sich in belichteten Pflanzen in höherer Konzentration als in etiolierten; ABS-ähnliche Inhibitoren entstehen in vitro bei Belichtung von Violaxanthin mit starkem Tageslicht (TAYLOR a. BURDEN 1970). Die vielfältigen Wirkungen der ABS als Antagonist der Gibberelline, Phytokinine und Auxine sind noch weitgehend unaufgeklärt (s. GALSTON a. DAVIES 1969); die sofortige Hemmung des IES-bedingten SW der Avena-Koleoptile durch ABS ließ NISSL (Diss. 1970) folgern, daß als "master-reaction" des IES-bedingten SW ein schnell reagierendes System präformiert in der Zelle vorliege. Dieses solle als allosterisch modulier-

bares Enzymsystem durch Auxine aktiviert und durch ABS gehemmt werden.

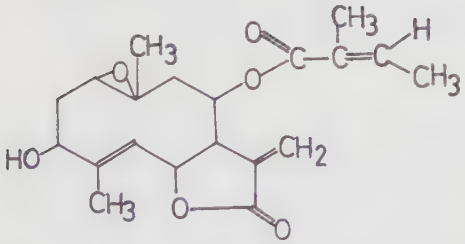
Ein gut untersuchtes System, welches den Auxin-Spiegel der Gewebe und damit das SW zu regulieren vermag, ist das der Peroxidase bzw. IES-Oxidase und ihrer Cofaktoren. Unter diesen wirken die Monophenole, wie das Flavonoid Kaempferol, aktivierend, und die o-Diphenole, wie z.B. Quercetin, hemmend. Die Synthese dieser Cofaktoren wird durch das Phytochrom-System gesteuert: Bei Hellrot-Bestrahlung wird über die Induktion der Enzyme Phenylalanin-Ammonia-Lyase und Zimtsäure-Hydroxylase in Erbsenstengeln die Synthese von Kaempferol, in Blättern dagegen die Synthese von Quercetin gefördert. Als Resultat wird das Etiolement der Pflanzen aufgehoben: das Epikotylwachstum wird gehemmt, da das Kaempferol die oxidative Zerstörung des Auxins fördert; die Blattspreiten wachsen aus, da das gebildete Quercetin die IES-Oxidase hemmt (s. Sammelartikel von GALSTON a. DAVIES 1969).

Diese einfache umgekehrte Korrelation zwischen der Aktivität der IES-Oxidase und der Wachstumsrate ist beim Helianthus-Keimling nicht zu finden: Dekapitierte und 1/2 Tag verarmte Hypokotyle wachsen mit und ohne IES-Zugabe stärker, als intakte, und decarboxylieren zugleich wesentlich mehr IES als intakte. Verantwortlich für die Wachstumshemmung intakter Hypokotyle sind u.a. Wachstumshemmstoffe (I_1, I_2 und I_3), die im Sproßgipfel, v.a. den Primärblättern, bei Belichtung (v.a. mit Blaulicht) entstehen und basalwärts abgegeben werden. Durch die Dekapitation wird dieser Inhibitoren-Strom unterbrochen. Die Situation wird noch dadurch kompliziert, daß 1/2 Tag verarmte Hypokotyle wuchsstoffartige Substanzen enthalten, die wohl für ihre hohe Wachstumsrate mitverantwortlich sind.
Gibt man zu 1/2 Tag verarmten Hypokotylen aus Primärblättern isolierten Inhibitor (I_3), dann wird von diesen mehr IES decarboxyliert als von den Kontrollen. Aus diesen verwirrenden Tatsachen kann nur gefolgert werden, daß die Aktivität der

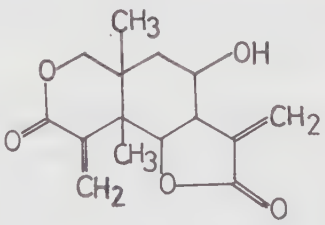
IES-Oxidase nicht in allen Geweben die Wachstumsrate kontrolliert. Der wirksame Angriffspunkt der gefundenen Inhibitoren muß an anderer Stelle liegen.

Die isolierten Inhibitoren gehören nach Vorkommen, Molekulargewicht, UV-Absorptionsspektren und chromatographischem Verhalten sehr wahrscheinlich zur Gruppe der Sesquiterpen-Lactone vom Typ des Heliangins, das von SHIBAOKA (1961) aus Helianthus tuberosus-Blättern isoliert und von MORIMOTO et al. (1966) in seiner Struktur aufgeklärt wurde. Auch das von SEQUEIRA et al. (1968) untersuchte Vernolepin gehört in diese Verbindungsklasse.

Heliangin:



Vernolepin:



Nach SHIBAOKA et al. (1967) ist für die Hemmwirkung des Heliangins und verwandter Verbindungen auf das SW die Exomethylengruppe am Lactonring verantwortlich; sie verbindet sich in vitro mit SH-Gruppen. Ob diese Reaktion für die wachstumshemmende Wirkung in vivo verantwortlich ist, sei noch dahingestellt. Dagegen sei daran erinnert, daß der sehr wirksame SW-Inhibitor Abscisinsäure ebenfalls zur Verbindungsklasse der Sesquiterpene gehört, jedoch keinen Lactonring und keine benachbarte Methylengruppe besitzt.

Einen Hinweis auf den Aktionsmodus des isolierten Inhibitors I_3 könnte die Kinetik der SW-Hemmung bei der Avena-Koleoptile geben: Ebenso wie durch ABS (s. NISSL, Diss. 1970) wird das IES-bedingte SW durch I_3 sofort gehemmt. Nach Entfernung von I_3 wird die vorherige IES-bedingte Wachstumsrate in ca.5 min

wieder erreicht: die Hemmung ist praktisch sofort reversibel. Das kann nur bedeuten, daß der Inhibitor ein präformiertes System moduliert. Dieses System scheint das gleiche zu sein, über welches bei ATP-Zugabe in Anaerobiose SW erfolgt.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wurde ein hypothetisches Bild entwickelt (s. Abb. 63), das die primären Vorgänge beim SW erklären soll. Folgende Fakten erschienen hierbei als wesentlich:
Avena-Koleoptilen zeigen in luftgesättigter und O_2-freier Lösung von niederem pH-Wert (Optimum: pH 3,9) gleicherweise starkes SW. Der Grund hierfür ist die Steigerung der Zellwand-Dehnbarkeit (s. HAGER et al. 1971).

Auch die Primärreaktion des IES-bedingten SW ist mit einer Steigerung der Zellwand-Dehnbarkeit verbunden (Lit. s. Einleitung zu Teil I!).

Die Tatsache, daß säurebedingtes und IES-bedingtes SW gleicherweise durch hohen pH-Wert der Versuchslösung reversibel gehemmt werden, führt zu dem Schluß, daß die Steigerung der Zellwand-Dehnbarkeit beim IES-bedingten SW durch die Abgabe von Protonen aus dem Plasmalemma zustande kommt. Durch die pH-Veränderung in bestimmten Zellwand-Kompartimenten werden u.U. Enzyme aktiviert, die Verknüpfungspunkte im Zellwandmaterial lösen (in welchem Zellwand-Anteil, steht hier nicht zur Diskussion).

Daß tatsächlich Protonen vom Plasmalemma nach außen gepumpt werden, kann aus der Hemmung des SW durch CCCP gefolgert werden: dieses steigert die Permeabilität von Membranen für H^+.

IES löst nur in atmenden Zellen SW aus: für die hypothetischen Protonenpumpen ist Energie in Form von ATP notwendig.
Das "endogene" und das IES-bedingte SW werden durch Anaerobiose gehemmt; von außen zugegebenes ATP und andere Nucleosidtriphosphate heben diese Hemmung, zumindest teilweise, wieder auf.

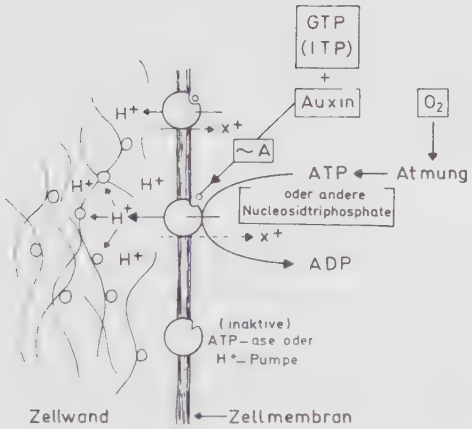


Abb. 63

Hypothetisches Modell der Auxinwirkung:
Das durch ITP oder GTP aktivierte Auxin-Molekül als allosterischer Effektor von membrangebundenen ATPasen, welche im Austausch gegen Kationen (X^+) Protonen nach außen pumpen.
Die Protonen bewirken Aktivierung von zellwanderweichenden Enzymen.

IES, in Anaerobiose zu den Koleoptilen gegeben, löst kein SW aus, außer in Anwesenheit von ITP oder GTP in der Versuchslösung:
Diese Verbindungen sind u.U. zur Aktivierung des Auxin-Moleküls notwendig, das in dem dargestellten Modell als positiver Effektor der Protonenpumpen-ATPasen fungiert. Im Austausch gegen Protonen werden möglicherweise andere Kationen in die Zelle aufgenommen, denn niedere Konzentrationen von K^+, Mg^{++} oder Ca^{++} vermögen das IES-bedingte SW in Aerobiose wie auch das ATP-bedingte SW in Anaerobiose beträchtlich zu stimulieren.

Es ist dabei durchaus offen, ob die aufgezählten Einzelerscheinungen nicht anders interpretiert werden können. Mit Sicherheit sind die Regulationsvorgänge beim SW komplexer als in diesem einfachen Schema skizziert ist. (Man denke dabei nur an die auxin-bedingte Atmungssteigerung und den "stored growth"-Effekt!) Es sollte deshalb eher als Arbeitshypothese denn als fertiges Ergebnis beurteilt werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Teil I

1. Mit der Methode der kontinuierlichen Messung des Wachstums von Avena-Koleoptilabschnitten in einer Durchflußkammer wurde die Zellstreckung in Lösungen verschiedener Wasserstoffionen-Konzentration gemessen.
In luftgesättigter oder O_2-freier Lösung ist bei niederem pH-Wert die Rate der Zellstreckung gleich; das pH-Optimum liegt in beiden Fällen bei pH 3,8; in pH 5,0 ist die Wachstumsrate etwa gleich der in H_2O dest.
Durch Lösungen von hohem pH-Wert (NaOH, 5 - 7,5 mMol/l, ca. pH 12) wird das säurebedingte SW innerhalb von 1 - 2 min "abgeschaltet", nach Wechsel zu pH 4,0 ebenso schnell wieder "angeschaltet".
Gleicherweise kann das IES-bedingte Streckungswachstum durch basische Lösungen (Puffer oder NaOH) reversibel "abgeschaltet" werden.

   Daraus wird geschlossen, daß der letzte Schritt der auxininduzierten Zellwanderweichung dem der säureinduzierten gleich ist und möglicherweise in einer durch niederen pH-Wert bedingten Aktivierung hydrolytischer Zellwandenzyme (Pektinasen u.a.) besteht.

   Cu^{II}-Ionen, welche als SH-Gruppen-Gift bekannt sind und die Dehnbarkeitserhöhung der Zellwände in Lösungen von niederem pH und in Pektinase-Lösung unterbinden (s. MENZEL 1966) hemmen das IES- und säurebedingte Wachstum in gleicher Weise. In hoher Konzentration (5 - 10 mMol/l) führen sie nach kurzzeitiger Applikation zum Zusammenbruch des Turgors: die Koleoptile schrumpft.

2. CCCP (m-Chlorcarbonylcyanid-phenylhydrazon), das Membranen für H^+ permeabel macht, wirkt unterschiedlich auf IES-bedingtes und säurebedingtes Streckungswachstum:

Das IES-bedingte SW wird bei allen CCCP-Konzentrationen praktisch sofort gehemmt (je nach Konzentration verschieden stark), bei niederen Konzentrationen reversibel, bei hohen irreversibel.
Beim säurebedingten SW wird die Hemmung bei 10 µMol/l CCCP erst nach 10 min sichtbar, bei höheren Konzentrationen etwas früher, aber in keinem Fall so frühzeitig wie beim IES-bedingten SW. Bei niederen Konzentrationen ist die Hemmung ebenfalls reversibel, bei hohen bricht der Turgor zusammen, die Koleoptile schrumpft.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, daß sich im Zuge der Auxin-Wirkung die Protonen-Konzentration in einem Zellwand-Kompartiment erhöht, was zur Aktivierung von Zellwand-Enzymen führen könnte (s. Diskussion!).

3. Das natürliche und das IES-bedingte SW werden (im Gegensatz zum säurebedingten) durch Entzug des Sauerstoffs reversibel gehemmt (aber nicht auf Null reduziert!). Zugabe von ATP (UTP, CTP, GTP, ITP) in Anaerobiose hebt diese Hemmung teilweise auf. Dabei wirken Kationen (K^+, Mg^{++}, Ca^{++}) als Cofaktoren mit einem Wirkungsoptimum von jeweils ca. 10 µMol/l. K^+ und Mg^{++} (und in geringerem Maße K^+ und Ca^{++}) wirken in höheren Konzentrationen additiv. Auch das IES-bedingte SW in Anaerobiose wird durch diese Ionen mit den gleichen Konzentrationsoptima moduliert. Bemerkenswert ist vor allem die Förderung des SW durch niedere Konzentrationen von $CaCl_2$.

4. Unter Anaerobiose gegebene IES löst in Anwesenheit von ATP (UTP, CTP) keine Wachstumsreaktion aus, aber zusammen mit ITP (GTP) ergibt sich eine typische IES-Wachstumskinetik mit Wachstumshemmung in der lag phase ("falscher Start") und anschließender Wachstumsförderung.

5. In Aerobiose hat ATP keinen Einfluß auf das IES-bedingte SW, ITP dagegen wandelt die lag phase zum "falschen Start"

um bzw. verlängert die lag phase, wenn es an ihrem Ende zugegeben wird. IDP und IMP sind wirkungslos.
Der Vergleich mit der gleichen Erscheinung beim "step up" in der Auxin-Konzentration, berichtet von RAYLE et al. (1970a) bietet sich an. Wahrscheinlich spielt ITP eine Rolle bei der Konformationsänderung allosterisch modulierter Membran-Enzyme.

6. In Lösung zugegebenes cyclisches 3', 5'-AMP hat in Kurzzeitversuchen weder in Aerobiose noch in Anaerobiose merklichen Einfluß auf das SW.

7. Das Phänomen des "stored growth"-Effektes nach O_2-Entzug wurde in IES-Lösung und IES-freiem Puffer untersucht. Nach Anaerobiose sind mit und ohne IES 2 Phasen des SW zu unterscheiden:

   a) eine zeitlich begrenzte schnelle Streckung nach einer kurzen Anaerobiose (5 - 30 min) und O_2-Zugabe; es wird ein "Überschuß" an Wachstum produziert;

   b) eine danach $\pm$ abrupt einsetzende langsamere Streckung, die in Puffer und H_2O etwa die Wachstumsrate vor der Anaerobiose fortsetzt. (In IES-Lösung ist die Wachstumsrate dieser Phase 2 umso geringer und schwankender, je länger die Anaerobiose vorher dauerte.)
   Phase 1 dominiert über die lag phase des IES-bedingten SW, wenn der Vorlauf bis zur IES-Zugabe anaerob war. Eine Erklärung ist noch nicht möglich.

Teil II

1. Mit der Methode des Schüttelversuchs und der Schattenriß-Photographie wurde die Kinetik des IES-bedingten SW von intakten und durch Dekapitation verschieden lange wuchsstoffverarmten Helianthus-Hypokotylabschnitten gemessen. Segmente von Hypokotylen, die 1/2 bis 1 Tag nach der Dekapitation zum Versuch verwendet wurden, sprechen auf IES

stärker an, als diejenigen von intakten Hypokotylen; sie zeigen innerhalb von 6 Stunden ca. 30 % mehr Zuwachs als diese.
In Teil III wurde diese Erscheinung genauer untersucht.

Die lag phase des IES-bedingten SW wird bei dekapitierten Hypokotylen entsprechend der Verarmungszeit immer länger. 4 1/2 Tage verarmte Pflanzen haben eine lag phase von mindestens einer Stunde. Der geringere Zuwachs der 3 1/2 Tage und länger verarmten Pflanzen nach IES-Zugabe konnte durch Zuckerzugabe oder Vorbehandlung mit $CaCl_2$ wieder gesteigert werden.

2. An den verschieden lang verarmten Helianthus-Hypokotylen wurde die IES-bedingte Atmungssteigerung gemessen (mit Hilfe des Warburg-Apparates).
Die prozentuale Atmungssteigerung entspricht dabei dem Gesamtzuwachs; sie ist am höchsten bei 1/2 Tag verarmten Pflanzen, die auch am stärksten wachsen. Die Atmungssteigerung ist bei allen Verarmungsgraden schon 1/2 Stunde nach IES-Zugabe sicher meßbar, selbst bei 4 1/2 Tage verarmten Pflanzen mit einer einstündigen lag phase des Wachstums.
Daraus wird geschlossen, daß die Atmungssteigerung mit der Primärreaktion des SW verbunden ist, d.h. daß sie ATP und andere Nucleosidtriphosphate für die energieabhängigen Vorgänge bei der Primärwirkung der Auxine liefert (s.o. u.u.!).

Teil III

1. Diffusate von abgeschnittenen belichteten Helianthus-Sproßgipfeln und Extrakte aus verschiedenen Geweben (Kotyledonen, Primärblätter, Hypokotyle von belichteten und unbelichteten Pflanzen) wurden auf ihren Gehalt an Wachstumshemmstoffen untersucht.
Mit Dauer-Weißlicht bestrahlte Primärblätter zeigten im Biotest die weitaus höchste Inhibitoraktivität; 1 Tag verarmte Hypokotyle enthalten Wuchsstoffe, die das IES-bedingte SW von Avena-Koleoptilen im Biotest steigern.
Nach 4 Tagen Dauerdunkel enthalten (vorher belichtete)

Primärblätter keine Inhibitoraktivität mehr.

2. Extrakte aus belichteten Primärblättern wurden papier- und dünnschichtchromatographisch getrennt.
Mit DS-Chromatographie wurden 3 Inhibitorzonen erhalten, welche die UV-Fluoreszenz löschen und mit DMCA, EHRLICH's Reagens und SALKOWSKI-TANG-Reagens charakteristische Farbreaktionen ergeben.

3. Die Untersuchung der Reinsubstanzen zeigte, daß es sich wahrscheinlich um Verbindungen handelt, die mit Heliangin (einem Sesquiterpen-Lacton, von SHIBAOKA und Mitarbeitern aus Hel.-tuberosus-Blättern isoliert und von MORIMOTO et al. strukturaufgeklärt) verwandt, aber nicht identisch sind.

4. Die Inhibitoren I_1, I_2 und I_3 (und ein nur durch Blaulicht induzierbarer Hemmstoff I_4) werden vor allem in Dauer-Blaulicht, in geringeren Mengen auch in Dauer-Rotlicht, keiner davon in Dauerdunkel gebildet. In Extrakten von völlig etiolierten Pflanzen tritt ein (nicht näher untersuchter) Wuchsstoff auf.

5. Die Wirkungsweise von I_3 in vivo wurde untersucht:

Die Decarboxylierungsrate von IES-1-^{14}C durch 1/2 Tag verarmte Hypokotylabschnitte ist mit I_3 um ca. 40 % höher als ohne I_3. Das könnte bedeuten, daß I_3 als Cofaktor der IES-Oxidasen den IES-Spiegel im Gewebe indirekt reduziert bzw. die Bildung des Wachstumshemmstoffes 3-Methylenoxindol fördert.
Jedoch decarboxylieren die (stärker wachsenden) 1/2 Tag verarmten Hypokotyle um ca. 35 % mehr IES-1-^{14}C als die intakten (weniger wachsenden, inhibitorhaltigen) Hypokotyle.
Daraus wurde geschlossen, daß die Aktivität der IES-Oxidasen im Gewebe und die Wachstumsrate nicht unbedingt kausal verbunden sind.

Die Kinetik der Wachstumshemmung der Avena-Koleoptile durch I_3 (gemessen mit der Methode von Teil I) zeigt, daß die Hemmung sofort eintritt und sofort reversibel ist. Daraus wird geschlossen, daß der biogene Wachstumshemmstoff I_3 wahrscheinlich als allosterischer Inhibitor der postulierten zellmembraneigenen Ionenpumpen wirkt.

Ein hypothetisches Modell der primären Auxin-Wirkung wird diskutiert, bei dem das (aktivierte) Auxin-Molekül als allosterischer Effektor von ATPasen des Plasmalemmas fungiert. Diese ATPasen sollen (im Austausch gegen Kationen) Protonen nach außen pumpen, welche zellwanderweichende Enzyme aktivieren.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ADDICOTT, T.F., K. OHKUMA, O.E. SMITH and W.E. THIESSEN:
Chemistry and physiology of abscisin II, an abscission accelerating hormone. Advan. Chem. Ser. 53, 97-105 (1966)

ANDREAE, W.A., and N.E. GOOD:
Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. IV. Conjugation with aspartic acid and ammonia as processes in the metabolism of carboxylic acids. Plant Physiol. 32, 566-572 (1957)

ANKER, L.:
The effect of indoleacetic acid and other growth promoting substances on the endogenous respiration of the Avena coleoptile. Acta Bot. Neerl. 2, 22-65 (1953)

ANKER, L.:
The influence of the pH on the growth and the geotropism of decapitated Avena coleoptiles supplied either with indoleacetic acid or with indoleacetonitrile. Acta Botan. Neerl. 7, 69-76 (1958)

ARMSTRONG, D. J.:
Hypothesis concerning the mechanism of auxin action. Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 64-66 (1966)

BAKER, D.B., and P.M. RAY:
Direct and indirect effects of auxin on cell wall synthesis in oat coleoptile tissue. Plant Physiol. 40, 345-352(1965)

BAKER, D.B., and P.M. RAY:
Relation between effects of auxin on cell wall synthesis and cell elongation. Plant Physiol. 40, 360-368 (1965)

BAUR, J.R., and M. WORKMAN:
Influence of carbonyl cyanide phenylhydrazone derivatives on the respiration rate of banana pulp tissue. Nature 201, 612 (1964)

BAYLEY, S.T., and G. SETTERFIELD:
The influence of mannitol and auxin on growth of cell walls of Avena coleoptiles. Ann. Bot. 21, 633-641 (1957)

BAXTER, R., and I.B. HANSON:
The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid upon the metabolism and composition of soybean hypocotyl mitochondria. Planta 82, 246-260 (1968)

BENNET-CLARK, T.A.:
A hypothesis on salt accumulation and the mode of action of auxin. In: The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances (R.L. WAIN and F. WIGHTMAN, eds.) p. 284-294. Butterworth Scientific Publications, London 1955

BONNER, J.:
The relation of hydrogen ions to the growth rate of the Avena coleoptile. Protoplasma 21, 406-423 (1934)

BONNER, J.:
On the mechanics of auxin-induced growth.
In: Plant Growth Regulation (R.M. KLEIN, ed.), p. 307-328, Iowa State University Press, Ames, Iowa 1961

BRAUNER, L., and M. BRAUNER:
The relation between water intake and oxybiosis in living plant tissue. II. The tensility of the cell wall.
Rev. Fac. Sci. Istanbul, Sér.B 8, 30-70 (1943)

BRAUNER, L. und M. HASMAN:
Weitere Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Heteroauxins bei der Wasseraufnahme von Pflanzenparenchym.
Protoplasma 41, 302-326 (1952)

BRAUNER, L. und A. HAGER:
Versuche zur Analyse der geotropischen Perzeption. I.
Planta 51, 115-147 (1958)

BRAUNER, L. und A. ZIPPERER:
Über die Anfangsphasen der geotropischen Krümmungsbewegung von Avena-Koleoptilen. Planta 57, 503-517 (1961)

BURSTRÖM, H.G.:
Calcium, water conditions, and growth of pea seedling stems. Physiol. Plant. 17, 207-219 (1964)

BURSTRÖM, H.G., I. UHRSTRÖM, and B. OLAUSSON:
Influence of auxin on Young's modulus in stems and roots of Pisum and the theory of changing the modulus in tissues.
Physiol. Plant. 23, 1223-1233 (1970)

BUSSE, M., und O. KANDLER:
Über die Wirkungen der ß-Indolylessigsäure auf den Stoffwechsel von Avena-Koleoptilen. Planta 46, 619-642 (1956)

CHAUDRY, I.H., and M.K. GOULD:
Evidence for the uptake of ATP by rat soleus muscle in vitro. Biochim. Biophys. Acta 196, 320-326 (1970)

CLELAND, R.:
The relation between auxin and metabolism.
In: Handbuch der Pflanzenphysiologie (W. RUHLAND, Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin 1961

CLELAND, R.:
Auxin-induced cell-wall loosening in the presence of actinomycin D. Plant Physiol. 40, 4, 595-600 (1965)

CLELAND, R.:
Auxin and the mechanical properties of the cell wall. Ann. N.Y. Acad. Sci. 144, 94-101 (1967a)

CLELAND, R.:
Extensibility of isolated cell walls: Measurement and changes during cell elongation.
Planta 74, 197-209 (1967b)

CLELAND, R.:
Auxin and wall extensibility: Reversibility of auxin-induced wall loosening. Science 160, 192 (1968)

CLELAND, R.:
Protein synthesis and wall extensibility in the Avena coleoptile. Planta 95, 218-226 (1970)

CLELAND, R.:
Instability of the growth-limiting proteins of the Avena coleoptile and their pool size in relation to auxin. Planta 99, 1-11 (1971)

COARTNEY, J.S., D.J. MORRÉ and JOE L. KEY:
Inhibition of RNA synthesis and auxin-induced cell wall extensibility and growth by actinomycin D.
Plant Physiol. 42, 434-439 (1967)

COOIL, B., and J. BONNER:
The nature of growth inhibition by calcium in the Avena coleoptile. Planta 48, 696-723 (1957)

DAHLHELM, H.:
Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Indolyl-3-Essigsäure mit Hilfe von schwerem Wasser.
Planta 86, 224-234 (1969)

DÖRFFLING, K.:
(+)-Abscisin II (Dormin) im Aetherextrakt von Pisum-sprossen. Naturw. 54, 23-24 (1967)

ELLIS, R.J., and I.R. MACDONALD:
Specificity of cycloheximide in higher plant systems.
Plant Physiol. 46, 227-232 (1970)

EVANS, M.L., and P.M. RAY:
Timing of the auxin response in coleoptiles and its implications regarding auxin action.
J. gen. Physiol. 53, 1-20 (1969)

FAN, D.F., and G.A. MACLACHLAN:
Control of cellulase activity by indole-acetic acid.
Can. Journ. Bot. 44, 1025-1034 (1966)

FRENCH, R.G., and H. BEEVERS:
Respiratory and growth responses induced by growth regulators and allied compounds.
Amer.J.Bot. 40, 660-666 (1953)

FREY-WYSSLING, A.:
Physiology of cell wall growth.
Ann. Rev. Plant Physiol. 1, 169 (1950)

FUKUYAMA, T.T., and H.S. MOYED:
Inhibition of cell growth by photooxidation products of indole-3-acetic acid.
J. biol. Chem. 239, 2392-2397 (1964)

FILNER, B., and R. HERTEL:
Some aspects of geotropism in coleoptiles.
Planta 94, 333 - 354 (1970)

FISHER, J., and T.K. HODGES:
Monovalent ion stimulated adenosine triphosphatase from oat roots. Plant Physiol. 44, 385 - 395 (1969)

GALSTON, A.W., and P.J. DAVIES:
Hormonal regulation in higher plants.
Science 163, 1288-1297 (1969)

GANOT, D., and L. REINHOLD:
The "acid growth effect" and geotropism.
Planta 95, 62 - 71 (1970)

GOLDSMITH, M.H.M.:
Comparison of aerobic and anaerobic movement of 3-indole-acetic acid in coleoptiles of oats and corn.
In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances (F. WIGHTMAN and G. SETTERFIELD, eds.)
Runge Press, Ottawa 1968

GURD, F.R.N., and P.E. WILCOX:
Complex formation between metallic cations and proteins, peptides, and amino acids.
Advan. Protein Chem. 11, 311 - 427 (1956)

HAGER, A.:
Untersuchungen über einen durch H^+-Ionen induzierbaren Zellstreckungsmechanismus.
Habilitationsschrift, München 1962

HAGER, A.:
Das geotropische "Gedächtnis" der Pflanzen.
In: Wachstumsregulatoren bei Pflanzen, p. 549-558
Intern. Vortragstagung Rostock/Kühlungsborn (1966)
Jena, VEB Fischer 1967

HAGER, A.:
Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. Planta 89, 224 - 243 (1969)

HAGER, A., und R. SCHMIDT:
Auxintransport und Phototropismus.
I. Die lichtbedingte Bildung eines Hemmstoffes für den Transport von Wuchsstoffen in Koleoptilen.
Planta 83, 347 - 371 (1968a)

HAGER, A., und R. SCHMIDT:
Auxintransport und Phototropismus.
II. Der Hemmechamismus des aus IES gebildeten Photooxidationsproduktes 3-Methylenoxindol beim Transport von Wuchsstoffen. Planta 83, 372 - 386 (1968b)

HAGER, A., H. MENZEL und A.KRAUSS:
Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. Planta 100, 47 - 75 (1971)

HALL, J.L.:
A histochemical study of adenosine triphosphatase and other nucleotide phosphatases in young root tips.
Planta 89, 254 - 265 (1969)

HALL, J.L.:
Pinocytotic vesicles and ion transport in plant cells.
Nature 226, 1253 - 1254 (1970)

HALL, J.L., and V.S. BUTT:
Adenosine triphosphatase activity in cell wall preparations and excised roots of barley.
J. Exp. Bot. 20, 751 - 762 (1969)

HAROLD, F.M., and J.R. BAARDA:
Inhibition of membrane transport in Streptococcus faecalis by uncouplers of oxidative phosphorylation and its relationship to proton conduction.
J. Bacteriol. 96, 2025 - 2034 (1968)

HAROLD, F.M., E. PAVLASOVA'and J.R. BAARDA:
A transmembrane pH-gradient in Streptococcus faecalis: Origin, and dissipation by proton conductors and N, N'-dicyclohexylcarbodiimid.
Biochim. Biophys. Acta 196, 235 - 244 (1970)

HEMBERG, T.:
Biogenous inhibitors.
In: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 14, p.1162-1184 (W. RUHLAND Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin 1961

HERTEL, R., M.L. EVANS, A.C. LEOPOLD, and H.M. SELL:
The specificity of the auxin transport system.
Planta 85, 238 - 249 (1969)

HEYN, A.N.J.:
Der Mechanismus der Zellstreckung.
Rec. trav. botan. neerl. 28, 113-244 (1931)

HEYN, A.N.J.:
The physiology of cell elongation.
Bot. Rev. 6, 515-574 (1940)

HEYN, A.N.J.:
Dextranase activity in coleoptiles of Avena.
Science 167, 874-875 (1970a)

HEYN, A.N.J.:
Dextranase activity and auxin-induced cell elongation in coleoptiles of Avena.
Biochem. and Biophys. Research Comm. 38, (1970b)

HOPFER, U., A.L. LEHNINGER, and T.E. THOMPSON:
Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation.
Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 484-490 (1968)

KAMISAKA, S., and Y. MASUDA:
Stimulation of auxin-induced cell expansion in plant tissue by cyclic 3', 5'-adenosine-monophosphate.
Naturw. 57, 546 (1970)

KONISHI, M., and A.W. GALSTON:
Light-induced changes in phenolic inhibitors of indole-acetic acid oxidase in cotyledons of Pharbitis nil.
Phytochemistry 3, 559-568 (1964)

MANTAI, K.E.:
Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone as an inhibitor of coupled electron transport in trypsin treated spinach chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 189, 449-451 (1969)

MARRÈ, E., and G. FORTI:
Metabolic responses to auxin. III. The effect of auxin on ATP level as related to the auxin induced respiration increase. Physiol. Plant. 11, 36-47 (1958)

MAST, C.A. VAN DER:
The inhibiting effect of caffeic acid on the enzymatic degradation of IAA is exerted via the non-IAA degrading peroxidases. Acta Bot. Neerl. 19 (5), 659-664 (1970a)

MAST, C.A. VAN DER:
The influence of membrane-bound peroxidases on the degradation of IAA by the specific IAA degrading protein complexes in homogenates of pea roots.
Acta Bot. Neerl. 19 (5), 727-736 (1970b)

MASUDA, Y.:
Auxin-induced growth of tuber tissue of Jerusalem artichoke. I. Cell physiological studies on the expansion growth. Bot. Mag. Tokyo 78, 417-423 (1965)

MASUDA, Y.:
Role of cell-wall-degrading enzymes in cell-wall loosening in oat coleoptiles. Planta 83, 171-184 (1968)

MASUDA, Y.:
Auxin-induced cell expansion in relation to cell wall extensibility. Plant a. Cell Physiol. 10, 1-9 (1969)

MASUDA, Y., and S. KAMISAKA:
Rapid stimulation of RNA biosynthesis by auxin.
Plant a. Cell Physiol. 10, 79-86 (1969)

MASUDA, Y., S. OI, and Y. SATOMURA:
Further studies on the role of cell-wall-degrading enzymes in cell-wall loosening in oat coleoptiles.
Plant a. Cell Physiol. 11, 631-638 (1970)

McDANIEL, R.G., and I.V. SARKISSIAN:
Enhancement of oxidation and phosphorylation of maize scutellum mitochondria by physiological concentrations of indoleacetic acid.
Physiol. Plant. 19, 187-193 (1966)

MENZEL, H.:
Die pH-abhängige Veränderung mechanischer und chemischer Eigenschaften der Zellwand und ihr Zusammenhang mit der Wuchsstoffwirkung.
Dissertation, Naturw. Fak. Univ. München (1966)

MITCHELL, K.K., and I.V. SARKISSIAN:
Effects of indolyl-3 acetic acid on the citrate-condensing reaction by preparations of root and shoot tissue.
J. Exp. Bot. 17, 838-843 (1966)

MITCHELL, P.:
Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. 41, 445-502 (1966)

MITCHELL, P.:
Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and solar cells. Fed. Proc. 26, 1370-1379 (1967)

MITSUHASHI, M., and H. SHIBAOKA:
Isolation of an inhibitor of growth and root formation from Portulaca grandiflora leaves.
Plant a. Cell Physiol. 6, 87-99 (1965)

MONOD, J., J.P. CHANGEUX, and F. JACOB:
Allosteric proteins and cellular control systems.
J. Mol. Biol. 6, 306-329 (1963)

MONOD, J., J. WYMAN, and J.P. CHANGEUX:
On the nature of allosteric transitions: A plausible model. J. Mol. Biol. 12, 88-118 (1965)

MORIMOTO, H., Y. SANNO, and H.OSHIO:
Chemical studies on heliangine. A new sesquiterpene lactone isolated from the leaves of Helianthus tuberosus. Tetrahedron Letters 22, 3173-3179 (1966)

MORRÉ, D.J., and W.R. EISINGER:
Cell wall extensibility: its control by auxin and relationship to cell elongation.
In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. (F. WIGHTMAN and G. SETTERFIELD, eds.) p. 625-646. Runge Press, Ottawa 1968

MOYED, H.S., and V. TULI:
The oxindole pathway of 3-indoleacetic acid metabolism and the action of auxins. In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. (F. WIGHTMAN and G. SETTERFIELD, eds.) p. 289-300. Runge Press, Ottawa 1968

NAKAZAWA, T., K. ASAMI, R. SHOGER, A. FUJIWARA and I. YASUMASU:
Ca^{++} uptake, H^{+} ejection and respiration in sea urchin eggs on fertilization.
Exptl. cell res. 63, 143-146 (1970)

NELSON, H., J.ILAN, and L. REINHOLD:
The effect of inhibition of protein and RNA synthesis on auxin-induced growth.
Israel J. Botany 18, 129-134 (1969)

NEUMANN, P.M.:
Possible involvement of a glycerophosphate compound in auxin induced growth. Planta 99, 56-62 (1971)

NEWCOMB, E.H.:
Dissociation of the effects of auxin on metabolism and growth of cultured tobacco pith.
Physiol. Plant. 13, 459-467 (1960)

NISSL, D.:
Beiträge zum Wirkungsmechanismus der Auxine.
Dissertation,München 1970

NISSL, D., and M.H. ZENK:
Evidence against induction of protein synthesis during auxin-induced initial elongation of Avena coleoptiles.
Planta 89, 323-341 (1969)

NITSCH, J.P., and C. NITSCH:
Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. Plant Physiol. 31, 94-111 (1956)

NORRIS, W.E. jr.:
Reversal of ethionine-induced inhibition of elongation of Avena coleoptiles by adenosine triphosphate. Arch. Biochem. 108, 352-355 (1964)

PASSOW,H., A. ROTHSTEIN, and T.W. CLARKSON:
The general pharmacology of the heavy metals. Pharmacol. Rev. 13, 185-224 (1961)

PAVLASOVA, E., and F.M. HAROLD:
Energy coupling in the transport of ß-galactosides by Escherichia coli: Effect of proton conductors. J. Bact. 98, 198-204 (1969)

PENNY, P. and A.W. GALSTON:
The kinetics of inhibition of auxin-induced growth in green pea stem segments by actinomycin D and other substances. Am. J. Bot. 53 1-7 (1966)

PICKARD, B.G.:
Comparison of calcium and lanthanon ions in the Avena-coleoptile growth test. Planta 91, 314-320 (1970)

PILET, P.E.:
Action du fluor et de l'acide ß-indolylacétique sur la respiration des tissus radiculaires. Rev. gén. Bot. 71, 12-21 (1964)

PITMAN, M.G.:
Active H^+ efflux from cells of low-salt barley roots during salt accumulation. Plant Physiol. 45,787-790 (1970)

POHL, R.:
Ein Beitrag zur Analyse des Streckungswachstums der Pflanzen. Planta 36, 230-261 (1948)

POJNAR, E., and E.C. COCKING:
Cell-wall regeneration by isolated tomato-fruit protoplasts. Biochem. J. 103, 74 (1967)

POP, E., V. SORAN and G. LAZĂR :
The effect of ATP (disodium salt) upon rotational streaming. Physiol. plant. 20, 617-623 (1967)

RAY, P.M.:
Hormonal regulation of plant cell growth. In: Control Mechanisms in Cellular Processes. (D.M. BONNER ed.) p. 185-212. Ronald Press,N.Y. 1960

RAY, P.M.:
Cell wall synthesis and cell elongation in oat coleoptile tissue. Amer. J. Bot. 49, 928-939 (1962)

RAY, P.M., and K.B. BAKER:
Promotion of cell wall synthesis by indolylacetic acid.
Nature 195, 1322 (1962)

RAY, P.M., and A.W. RUESINK:
Kinetic experiments on the nature of the growth mechanism in oat coleoptile cells.
Developmental Biology, 4, 377-397(1962)

RAYLE, D.L., and R. CLELAND:
Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions.
Plant Physiol. 46, 250-253 (1970)

RAYLE, D.L., M.L. EVANS, and R. HERTEL:
Action of auxin on cell elongation.
Proc. Nat. Acad. Sci. 65, 184-191 (1970a)

RAYLE, D.L., P.M. HAUGHTON, and R. CLELAND:
An in vitro system that stimulates plant cell extension growth. Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1814-1817 (1970b)

REID, R.A., J. MOYLE, and P. MITCHELL:
Synthesis of adenosine triphosphate by a proton-motive force in rat liver mitochondria.
Nature 212, 257-258 (1966)

REIFF, B., und H.v. GUTTENBERG:
Über die Förderung des polaren Wuchsstofftransportes durch ATP. Naturw. 46, 235-236 (1959)

REIFF, B., und H.v. GUTTENBERG:
Der polare Wuchsstofftransport von Helianthus annuus in seiner Abhängigkeit von Alter, Quellungszustand und Kohlenhydratversorgung des Gewebes.
Flora 151, 44-72 (1961)

REILLY, C., G.F. FUHRMANN, and A. ROTHSTEIN:
The inhibition of K^+ and phosphate uptake in yeast by cycloheximide. Biochim. Biophys. Acta 203, 583-585 (1970)

ROGGEN, H.P.J.R., and R.G. STANLEY:
Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension.
Planta 84, 295-303 (1969)

ROSENTHAL, A.S., F.M. KREGENOW, and H.MOSES:
Some characteristics of a Ca^{2+}-dependent ATPase activity associated with a group of erythrocyte membrane proteins which from fibrils.
Biochim. Biophys. Acta 196, 254-262 (1970)

VAN SANTEN, A.M.A.:
Groei, groeistof en pH.
Dissertation, Utrecht 1940

SARKISSIAN, I.V.:
Nature of molecular action of 3-indoleacetic acid. In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances (F. WIGHTMAN and G. SETTERFIELD, eds.) p. 473-485. Runge Press, Ottawa 1968

SEGAL, L.:
Schädigende und fördernde Einflüsse von Säuren und Puffergemischen auf das Streckungswachstum. Biol. Zentralblatt 79, 321-336 (1960)

SEITZ, K.:
Die Ursache der Phototaxis der Chloroplasten: ein ATP-Gradient? (Versuche zum Primärprozeß der Starklichtbewegung bei Vallisneria). Z. Pflanzenphysiol. 64, 241-256 (1971)

SEQUEIRA, L., R.J. HEMINGWAY, and S.M. KUPCHAN:
Vernolepin: A new, reversible plant growth inhibitor. Science 161, 789-790 (1968)

SHIBAOKA, H.:
Studies on the mechanism of growth inhibiting effect of light. Plant a. Cell Physiol. 2, 175-197 (1961)

SHIBAOKA, H., and H.IMASEKI:
Identification of growth inhibitors in Helianthus leaves. Bot. Mag. Tokyo 70, 362-369 (1957)

SHIBAOKA, H., M. SHIMOKORIYAMA, S. IRIUCHIJIMA, and S. TAMURA:
Promoting activity of terpenic lactones in Phaseolus rootingand their reactivity toward cysteine. Plant a. Cell Physiol. 8, 297-305 (1967)

SHIBAOKA, H., M. MITSUHASHI, and M. SHIMOKORIYAMA:
Promotion of adventitious root formation by heliangine and its removal by cysteine. Plant a. Cell Physiol. 8, 161-170 (1967)

SHIBAOKA, H., T. Anzai, M. MITSUHASHI and M. SHIMOKORIYAMA:
Interaction between heliangine and pyrimidines in adventitious root formation of Phaseolus cuttings. Plant Physiol. 8, 647-656 (1967)

SÖDING, H.:
Über das Streckungswachstum der Zellwand. Ber. deutsch. bot. Ges. 50, 117-123 (1932)

SPERLING, E. and G. LATIES:
The dependence of auxin-induced growth on auxin-independent metabolic changes in slices of storage tissue. Plant Physiol. 38, 546-550 (1963)

STENLID, G.:
The effects of flavonoid compounds on oxidative phosphorylation and on the enzymatic destruction of indoleacetic acid. Physiol. Plant. 16, 110-120 (1963)

STRUGGER, S.:
Die Beeinflussung des Wachstums und des Geotropismus durch die Wasserstoffionen.
Ber. dtsch. Bot. Ges. 50, Anhang, 77-92 (1932)

TANIMOTO, E. and Y. MASUDA:
Effect of auxin in cell wall degrading enzymes.
Physiol. Plant. 21, 820-826 (1968)

TAYLOR, H.F. and R.S. BURDEN:
Identification of plant growth inhibitors produced by photolysis of violaxanthin.
Phytochem. 9, 2217-2223 (1970)

TRÄUBLE, H.:
Phasenumwandlungen in Lipiden. Mögliche Schaltprozesse in biologischen Membranen. Naturwiss. 58, 277-284 (1971)

UHRSTRÖM, I.:
The time effect of auxin and calcium on growth and elastic modulus in hypocotyls.
Physiol. Plant. 22, 271-287 (1969)

WAREING, P.F., J. GOOD and J. MANUEL:
Some possible physiological roles of abscisic acid.
In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances (F. WIGHTMAN and G. SETTERFIELD, eds.), p. 1561-1579.
Runge Press, Ottawa 1968

WEIGL, J.:
Wechselwirkung pflanzlicher Wachstumshormone mit Membranen.
Z. Naturforschg. 24 b, 1046-1052 (1969)

WILSON, K.:
The growth of plant cell walls.
Intern. Rev. Cytology 17, 1-49 (1964)

ZENK, M.H.:
Isolation, biosynthesis and function of indoleacetic acid conjugates. In: Régulateurs Naturels de la Croissance Végétale. p. 241-249. C.N.R.S., Paris 1964

ZENK, M.H.:
Untersuchungen zum Phototropismus der Avena-Koleoptile.
I. Photooxidation in vivo. Z.Pflanzenphysiol.56,57-69 (1967a)
II. Pigmente. Z.Pflanzenphysiol. 56, 122-140 (1967a)

ZENK, M.H.:
Wachstum. Fortschr.d.Botanik 29, 123-143 (1967b)

ZENK, M.H.:
The action of light on the metabolism of auxin in relation to Phototropism. In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances (F.WIGHTMAN and G. SETTERFIELD, eds.)
p. 1109-1128. Runge Press, Ottawa 1968

ZENK, M.H., and G. MÜLLER:
In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. Nature 200, 761-763 (1963)

ZENK, M.H., and G. MÜLLER:
Über den Einfluß der Wundflächen auf die enzymatische Oxydation der Indol-3-Essigsäure.
Planta 61, 346-351 (1964)

ZENK, M.H., and D. NISSL:
Evidence against an allosteric effect of indole-3-acetic acid on citrate synthase. Naturw. 55, 84-85 (1968)

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Hager angefertigt.
Für die Überlassung des Themas und die Anregungen und Ratschläge zu dessen Bearbeitung wie auch die Anteilnahme am Fortgang der Arbeit danke ich ihm herzlich.

Herrn Prof. Dr. L. Brauner und Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft.

L e b e n s l a u f

Am 26. Dezember 1938 wurde ich, Annelore Krauß, als Tochter des Schriftleiters Dr. Hans Krauß und seiner Ehefrau Eleonore, geb. Albrecht, in Würzburg geboren. Von 1944 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Harsdorf bei Bayreuth, von 1949 bis 1958 das Städtische Realgymnasium für Mädchen in Bayreuth.

Im Juli 1958 legte ich dort das Abitur ab und immatrikulierte mich im November desselben Jahres zunächst an der Philosophischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München in den Fächern Germanistik, Geschichte und Geographie.

Nach dem ersten Semester wechselte ich zur Naturwissenschaftlichen Fakultät über und studierte Biologie, Chemie und Geographie an derselben Universität. 1963 legte ich in diesen Fächern die erste und 1964 die zweite wissenschaftliche Teilprüfung des Staatsexamens für das Lehramt an Höheren Schulen ab.

Anschließend begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Hager mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Botanischen Institut der Universität München.

Vom 1. Dezember 1967 bis 3. November 1969 nahm ich am Pädagogischen Seminar am Rupprecht-Gymnasium in München teil und legte die pädagogische Prüfung ab.

Anschließend beendete ich die vorliegende Arbeit, während ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Botanischen Institut der Universität München angestellt war.